

SÉRIE A, N° 1917

N° D'ORDRE :

2784

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

PAR

Marguerite FAURE

Licenciée ès-sciences

Assistante à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux

née à Toulon le 12 Octobre 1910

— ✕ —

1^{re} THÈSE. — Contribution à l'étude des haptènes lipoïdiques de fixation de l'alexine. Recherches sur l'haptène lipoïdique et les phosphatides du Bacille tuberculeux.

2^{me} THÈSE. — Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 19 , devant la Commission d'examen.

22 JANV 1940.

JURY :

Président : M. JAVILLIER, *Professeur.*

Examineurs { MM. AUBEL, *Professeur.*
MONNIER, *Maître de Conférence.*

PARIS

—
1940

SÉRIE A, n° 1917

N° D'ORDRE :

2784

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

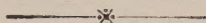
PAR

Marguerite FAURE

Licenciée ès-sciences

Assistante à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux

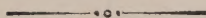
née à Toulon le 12 Octobre 1910



1^{re} THÈSE. — Contribution à l'étude des haptènes lipoïdiques de fixation de l'alexine. Recherches sur l'haptène lipoïdique et les phosphatides du Bacille tuberculeux.

2^{me} THÈSE. — Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 19 , devant la Commission d'examen.



JURY :

Président : M. JAVILLIER, *Professeur*.

Examineurs { MM. AUBEL, *Professeur*.
MONNIER, *Maître de Conférence*.

PARIS

—
1939

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM.

Doyen honoraire M. MOLLIARD.
Doyen C. MAURAIN, Professeur, Physique du Globe.

Professeurs honoraires.	DANGEARD.	LESPIEAU.	ABRAHAM.
	H. LEBESGUE.	MARCHIS.	Ch. FABRY.
	Emile PICARD.	VESSIOT.	Léon BERTRAND.
	Léon BRILLOUIN.	PORTIER.	WINTREBERT.
	PECHARD.	MOLLIARD.	DUBOSQ.
	FREUNDLER.	LAPICQUE.	BOHN.
	AUGER.	G. BERTRAND.	RABAUD.

PROFESSEURS

M. CAULLERY	 T	Zoologie (Evolution des êtres organisés).	CHRETIEN		Optique appliquée.
Emile BOREL	 T	Calcul des probabilités et Physique mathématique.	P. JOB		Chimie générale.
Jean PERRIN	 T	Chimie physique.	LABROUSTE		Physique du Globe.
E. CARTAN	 T	Géométrie supérieure.	PRENANT	 T	Anatomie et Histologie comparées.
A. COTTON	 T	Recherches physiques.	VILLEY		Mécanique physique et expérimentale.
J. DRACH	 T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	COMBES	 T	Physiologie végétale.
Charles PEREZ	 T	Zoologie.	GARNIER	 T	Mathématiques générales.
M. GUICHARD	 T	Analyse et mesures chimiques.	PÉRES		Mécanique théorique des fluides.
Paul MONTEL	 T	Théorie des fonctions et Théorie des transformations.	HACKSPILL	 T	Chimie minérale.
L. BLARINGHEM	 T	Botanique.	LAUGIER	 T	Physiologie générale.
G. JULIA	 T	Mécanique analytique et Mécanique céleste.	TOUSSAINT		Technique Aéronautique.
C. MAUGUIN	 T	Minéralogie.	M. CURIE		Physique (P. C. B.).
A. MICHEL-LEVY	 T	Pétrographie.	G. RIBAUD	 T	Hautes températures.
A. DENJOY	 T	Application de l'analyse à la Géométrie.	CHAZY	 T	Mécanique rationnelle.
L. LUTAUD	 T	Géographie physique et géologie dynamique.	GAULT		Chimie (P. C. B.).
Eugène BLOCH	 T	Physique.	CROZE		Recherches physiques.
G. BRUHAT	 T	Physique théorique et physique céleste.	DUPONT	 T	Théories chimiques.
E. DARMOIS	 T	Enseignement de Physique.	LANQUINE	 T	Géologie structurale et Géologie appliquée.
A. DEBIERNE	 T	Physique Générale et Radioactivité.	VALIRON		Mathématiques générales.
A. DUFOUR	 T	Physique (P. C. B.).	BARRABÉ		Géologie structurale et géologie appliquée.
L. DUNOYER	 T	Optique appliquée.	MILLOT		Biologie animale (P. C. B.).
A. GUILLIERMOND	 T	Botanique.	F. PERRIN		Théories physiques.
M. JAVILLIER	 T	Chimie biologique.	VAVON		Chimie organique.
ROBERT-LEVY	 T	Physiologie comparée.	G. DARMOIS		Calcul des probabilités et Physique-Mathématique.
Henri VILLAT	 T	Mécanique des fluides et applications.	CHATTON	 T	Biologie maritime.
Ch. JACOB	 T	Géologie.	AUBEL		Chimie biologique.
P. PASCAL	 T	Chimie générale.	Jacques BOURCART		Géographie physique et Géologie dynamique.
M. FRECHET	 T	Calcul différentiel et Calcul intégral.	M ^{me} JOLIOT-CURIE		Physique générale et Radioactivité.
E. ESCLANGON	 T	Astronomie.	PLANTEFOL		Biologie végétale (P. C. B.).
M ^{me} RAMART-LUCAS	 T	Chimie organique.	CABANNES		Enseignement de Physique.
H. BEGHIN	 T	Mécanique physique et expérimentale.	GRASSÉ		Biologie animale (P. C. B.).
FOCH	 T	Mécanique expérimentale des fluides.	PREVOST		Chimie (P. C. B.).
PAUTHENIER		Physique (P. C. B.).	BOULIGAND		Mathématiques.
De BROGLIE	 T	Théories physiques.	CHAUDRON		Chimie (P. C. B.).

Secrétaire A. PACAUD.
Secrétaire honoraire D. TOMBECK.

A MES PARENTS

A la mémoire de
MONSIEUR LE DOCTEUR A. CALMETTE
Sous-Directeur de l'Institut Pasteur
Membre de l'Académie de Médecine
Membre de l'Académie des Sciences

*A qui nous devons d'avoir orienté
nos études et nos recherches vers la
bactériologie et qui nous a fait le très
grand honneur de nous admettre parmi
ses élèves à l'Institut Pasteur.*

*Témoignage de très profond respect
et de reconnaissance.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR JAVILLIER

Professeur de Chimie Biologique
à la Faculté des Sciences de Paris
Membre de l'Académie des Sciences

*dont l'enseignement si lumineux nous
a attirée vers les laboratoires de re-
cherches biochimiques et qui a bien
voulu nous conseiller dans nos études.*

*Après nous avoir réservé un accueil
très bienveillant lorsque nous lui avons
remis notre manuscrit, il nous a fait le
grand honneur d'accepter la présidence
du jury de cette thèse.*

*Témoignage de notre profonde gra-
titude.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR MACHEBŒUF

Professeur de Chimie biologique et médicale
à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux
Ancien Chef de Service à l'Institut Pasteur de Paris

qui nous a accueillie dans son laboratoire et nous a initiée aux recherches scientifiques. Depuis, il n'a cessé de nous témoigner sa confiance en nous associant à ses travaux et en nous faisant le grand honneur de nous donner la charge d'assistante.

Après nous avoir inspiré le sujet de cette thèse, il nous a prodigué journellement ses précieuses directives et ses encouragements.

Nous sommes heureuse de lui exprimer notre très sincère reconnaissance.

A NOS CAMARADES

du Laboratoire de Chimie de la Tuberculose à l'Institut Pasteur
de Paris et du Laboratoire de Chimie biologique et médicale de la
Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux

Ce travail effectué sous la direction de Monsieur le Professeur
MACHEBOEUF, a été commencé en 1933 dans le Laboratoire de
Chimie de l'Institut de la Tuberculose à l'Institut Pasteur de
Paris et a pu être poursuivi depuis 1937 au Laboratoire de Chimie
biologique et Médicale de la Faculté de Médecine et de Pharmacie
de Bordeaux, grâce à une subvention accordée par le Ministère
de l'Hygiène.

TABLE DES MATIÈRES

PREMIÈRE PARTIE

ÉTUDE HISTORIQUE

CHAPITRE I. — <i>Etude des haptènes lipoidiques</i>	11
La réaction de fixation de l'alexine et les haptènes lipoidiques de fixation de l'alexine	13
L'haptène de Forssman	17
L'haptène de Wassermann	36
Les haptènes spécifiques des organes	43
L'haptène lipoidique du Bacille tuberculeux	45
Etude sérologique des acides aliphatiques, des phosphatides et des stérols (du point de vue haptène de fixation de l'alexine)	52
Conclusions et caractères généraux des haptènes lipoidiques	56
« Antigènes complets » glucido-lipidiques	58
CHAPITRE II. — <i>Etude chimique des phosphatides du Bacille Tuberculeux</i>	59
Les lipides du Bacille tuberculeux	59
Les phosphatides du Bacille tuberculeux	61

DEUXIÈME PARTIE

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE

DE L'HAPTÈNE LIPOÏDIQUE ET DES PHOSPHATIDES DU BACILLE TUBERCULEUX

<i>Les techniques</i>	67
CHAPITRE I. — <i>Extraction de l'haptène lipoidique contenu dans les Bacilles tuberculeux</i>	79

<i>La matière première : les « Bacilles de la Tuberculine »</i>	81
<i>Extraction de l'haptène lipoidique contenu dans les « Bacilles de la Tuberculine »</i>	83
Quelques propriétés de l'haptène lipoidique étudiées au cours des essais préliminaires	85
<i>Traitement de 12 kg. de « Bacilles de la Tuberculine »</i>	92
1. Extraction acétonique	92
2. Extraction alcoolique	94
3. Elimination des substances non lipidiques contenues dans l'extrait alcoolique	96
4. Extraction de l'haptène lipoidique par l'éther	98
5. Elimination des cires par l'acétone bouillante	99
<i>Résumé et conclusions du chapitre I</i>	102
Nouvelle méthode d'extraction de l'haptène lipoidique contenu dans les « Bacilles de la Tuberculine »	104
 CHAPITRE II. — <i>Fractionnement de la fraction lipidique hapténique, c'est-à-dire de la fraction soluble dans l'éther et insoluble dans l'acétone bouillante</i>	109
1. <i>Essai d'isolement de l'haptène lipoidique : séparation des fractions les plus actives</i>	111
Fractionnement par le chloroforme et l'alcool méthylique	112
Fractionnement par l'alcool méthylique	114
Modification de la composition chimique au cours de ces fractionnements	118
Fractionnement par l'alcool à 50 c. et le chlorure de sodium	120
Purification par l'alcool à 50 c. et le chlorure de sodium	123
Fractionnement par la pyridine	125
Fractionnement par l'acide acétique glacial et l'acétone	125

Propriétés et composition des fractions les plus actives	128
Essais infructueux de fractionnement des fractions les plus actives	132
Conclusions	137
2. <i>Séparation et étude des fractions inactives plus solubles dans l'alcool que les fractions les plus actives</i>	139
3. <i>Séparation des fractions peu actives moins solubles dans l'alcool que les fractions les plus actives</i>	146
Résumé et conclusions du chapitre II	148
CHAPITRE III. — <i>Etude chimique des trois types de fractions séparées des lipides solubles dans l'éther et insolubles dans l'acétone bouillante</i>	155
Analyse minérale	157
Hydrolyse barytique :	
Etudes préliminaires effectuées avec des fractions très actives	159
Hydrolyse barytique comparative des trois types de fractions	171
Fractions hydrosolubles des hydrolysats barytiques :	
de la fraction la plus active [A]	171
de la fraction inactive la plus soluble [Ip]	181
de la fraction inactive la moins soluble [Im]	186
Comparaison des fractions hydrosolubles des hydrolysats des trois fractions [A], [Ip] et [Im]	192
Etudes des acides gras des trois fractions	197
Conclusions de l'étude comparative de la constitution chimique des trois fractions	199

<i>Hydrolyse sulfurique à froid d'une fraction très active</i>	202
Discussion et essais d'interprétation de certains résultats obtenus dans les hydrolyses barytiques des diverses fractions lipidiques et de l'hydrolyse sulfurique à froid	209
<i>Résumé et conclusions du chapitre III</i>	210
RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES	215
BIBLIOGRAPHIE	223

PREMIÈRE PARTIE

ÉTUDE HISTORIQUE

CHAPITRE I

ÉTUDE DES HAPTÈNES LIPOÏDIQUES DE FIXATION DE L'ALEXINE

L'immunité est une notion très ancienne, mais elle est restée purement empirique jusqu'à la fin du siècle dernier. Depuis longtemps, en effet, on avait observé que certaines maladies (rougeole, variole, etc...) ne récidivaient que très rarement chez un même sujet. Du fait de sa guérison, l'individu acquiert une résistance particulière; mais cette nouvelle résistance présente un caractère spécial et très frappant: elle est spécifique. Un organisme guéri de la rougeole, par exemple, est à l'abri d'une nouvelle atteinte par la même maladie, mais il n'est nullement protégé contre des infections différentes.

La découverte des microbes, agents déterminants et spécifiques des diverses maladies infectieuses, éclaira les phénomènes immunitaires jusqu'alors très mystérieux. L'œuvre pastoriennne montra, en effet, que l'hôte infecté se vaccine spécifiquement et uniquement contre le parasite qu'il héberge, mais le mécanisme même de cette vaccination restait encore très obscur.

Metchnikoff mit alors en évidence le rôle important de la phagocytose dans la défense de l'organisme contre les microbes pathogènes; mais ce processus biologique très général n'expliquait pas l'existence de la spécificité observée dans l'immunité.

L'étude de l'immunité fit un grand pas le jour où l'on découvrit que la résistance particulière d'un sujet vacciné s'accompagnait de l'apparition de nouvelles propriétés dans son sérum, ces propriétés sériques acquises par l'organisme sont spécifiques de l'infection comme l'immunité elle-même; on les attribua à la

présence dans l'immun sérum de substances hypothétiques : les *anticorps*. Si les anticorps ne représentent pas la totalité de l'état immunitaire, ils permettent néanmoins de pénétrer plus avant le mécanisme de défense de l'organisme contre les agents infectieux ; la découverte de leur existence a, de plus, considérablement facilité l'étude expérimentale et précise de l'immunité.

Bientôt, Bordet s'aperçut que ces phénomènes sérologiques observés dans le cas des maladies infectieuses ne représentaient qu'un exemple particulier d'un fait plus général. Point n'est besoin en effet, que l'organisme soit envahi par des microbes vivants, pour voir apparaître des anticorps dans son sérum ; les microbes morts et même les produits solubles qu'ils sécrètent ou contiennent (les toxines) produisent les mêmes effets, qui plus est, des substances qui ne possèdent aucun caractère agressifs vis-à-vis de l'organisme dans lequel on les introduit, tels des hématies ou de l'albumine sérique provenant d'une espèce étrangère, font apparaître des anticorps.

Ces substances qui, introduites dans un organisme animal, donnent naissance à des anticorps sont, par définition, des *antigènes*. Les anticorps ont la propriété de réagir spécifiquement avec les antigènes qui les ont engendrés. Si l'antigène est constitué par des éléments figurés (microbes, hématies), cette réaction se traduira *in vitro*, par exemple, par une agglutination et une lyse des éléments ; si l'antigène est une substance soluble (toxine, albumine) la réaction se traduira par l'apparition d'un précipité.

Le phénomène de la bactériolyse est complexe. Le premier, Bordet (14), en 1894, en a donné une explication claire et précise. Son expérience est la suivante : il injecte des vibrions cholériques à un cobaye. Après deux ou trois semaines, le sérum de cet animal acquiert la propriété de lyser ces microorganismes *in vitro*. Si l'on conserve, pendant plusieurs jours, ce sérum de cobaye anticholérique, hors de l'organisme animal, ou si on le chauffe à 56°, il perd sa propriété bactériolytique. Mais alors, il suffit d'ajouter au mélange des vibrions et du sérum anticholérique inactivé, du sérum frais d'un animal quelconque (immunisé ou non) pour voir se produire la lyse des microorganismes. Le phénomène de la bactériolyse résulte donc de la coopération de deux éléments : l'un spécifique, l'anticorps dénommé ici *sensibilisatrice* contenu dans le sérum anticholérique et qui résiste à un chauffage à 56°, l'autre non spécifique, l'*alexine* ou

complément ⁽¹⁾ présent dans tous les sérums frais d'animaux et qui est détruite par chauffage à 56°.

En 1898, Bordet (14) reproduit avec des hématies de Lapin les phénomènes observés avec les vibrions cholériques. Il obtient ainsi un sérum de Cobaye hémolytique pour les hématies de Lapin. Comme précédemment, ce sérum perd sa propriété hémolytique par chauffage à 56°, et il suffit de l'additionner d'alexine (sérum frais d'un animal quelconque) pour obtenir la lyse des hématies.

La réaction de fixation de l'alexine

(également dénommée réaction de déviation du complément, ou encore réaction de Bordet-Gengou)

Il n'est pas toujours aisé de constater l'union d'un anticorps avec son antigène même après action de l'alexine. Si le vibron cholérique est rapidement modifié dans ces conditions, d'autres bactéries ne sont détruites que lentement ou s'agglutinent mal. Il est au contraire très facile d'observer la lyse des hématies sous l'action combinée d'un sérum hémolytique et de l'alexine. En 1901, Bordet et Gengou (15) ont associé ces deux couples d'antigènes et d'anticorps dans une même réaction pour mettre en évidence, d'une manière simple et élégante, la présence d'un anticorps déterminé dans un sérum.

Dans le premier temps de la réaction, ces auteurs mettent en présence, dans des proportions convenables, un *anticorps* : sérum humain d'un sujet convalescent de fièvre typhoïde (ce sérum est chauffé à 56° pour détruire l'alexine), un *antigène* : émulsion de bacilles typhiques et de l'*alexine* : sérum frais d'homme sain. L'anticorps et l'antigène s'unissent pour former un complexe qui fixe l'alexine. Dans le deuxième temps de la réaction, ils ajoutent au mélange précédent des hématies de Lapin et du sérum de Cobaye hémolytique pour ces hématies (et également privé d'alexine par chauffage à 56°). L'alexine ayant été fixée dans le premier temps de la réaction, il ne se produit pas d'hémolyse. Les « hématies sensibilisées » (hématies + sérum

(1) Le mot alexine désigne une substance hypothétique à laquelle on attribue le pouvoir alexique des sérums frais. Seules les propriétés biologiques de cette substance sont connues à l'heure actuelle; on ignore totalement la nature de leur support.

hémolytique) qui ne peuvent se lyser qu'en présence d'alexine, jouent le rôle d'indicateur de la fixation de l'alexine dans le premier temps de la réaction ; mais cette fixation ne se produit que s'il y a eu union entre l'anticorps et son antigène avec lequel, seul, il réagit spécifiquement.

Une telle réaction permet donc de déceler soit un anticorps dans un sérum en présence d'un antigène déterminé, soit inversement un antigène à l'aide d'un anticorps connu. Elle s'est montrée très générale ; elle s'applique aussi bien à des anticorps antimicrobiens qu'à des anticorps obtenus par injection de substances non organisées et même d'antigènes artificiels. Dès sa découverte, cette réaction fut appliquée au sérodiagnostic de nombreuses affections, et aujourd'hui, on l'emploie couramment pour dépister la syphilis (réaction de Bordet-Wassermann) et parfois aussi démasquer la tuberculose lorsque la clinique et la bactérioscopie ont été impuissantes à la caractériser (réaction de Calmette-Massol), pour ne citer que les deux cas où elle est le plus utilisée. Son intérêt théorique n'est pas moindre, car cette réaction très sensible et très spécifique, a permis l'étude précise de nombreux problèmes immunologiques.

Les haptènes lipoidiques

A la suite des biologistes qui ont découvert, puis appliqué ces réactions sérologiques, les chimistes ont abordé l'étude de l'immunité. Ils ont cherché à connaître la nature des éléments qui entrent en jeu dans ces réactions, mais ils se sont particulièrement attachés à expliquer l'origine des spécificités si précises que l'on observe dans ces phénomènes.

Devant le nombre quasiment illimité des réactions immunitaires spécifiques, les premiers immunochimistes pensèrent que, seuls les protéides, grâce à leurs édifices infiniment complexes et variés étaient susceptibles de déterminer et d'expliquer ces spécificités. Mais, lorsque Landsteiner et V. Eisler, en 1904 et 1905 (83), puis Dautwitz et Landsteiner en 1907 (34) montrèrent que l'hémolyse engendrée par des sérums normaux pouvait être inhibée par des extraits d'hématies obtenus au moyen d'éther ou d'éther de pétrole, on commença à émettre quelques doutes sur le dogme de la nature purement protéidique des antigènes. Cette inhibition se montrant dans plusieurs cas nettement spécifique, on admit alors qu'une autre classe de composés : « les substances lipoidiques » pouvaient intervenir dans les réactions sérologiques.

A la suite de ces travaux, de nombreux auteurs ont montré que l'on peut utiliser comme antigène dans la réaction de la fixation de l'alexine, des extraits alcooliques du microorganisme ou de la substance qui a engendré les anticorps : extraits alcooliques de Bacilles tuberculeux (Much, K. Meyer), de Taenia (K. Meyer), d'organes de Cobaye (Sordelli et Fischer), de foie (dans le sérodiagnostic de la syphilis), etc.... les préparations antigéniques étant solubles dans les solvants des lipides, on les a dénommées *antigènes lipoidiques*. Mais, si l'on injecte à des animaux, ces préparations lipoidiques (après les avoir mises en suspension dans de l'eau et après en avoir éliminé l'alcool), on n'obtient que peu ou pas d'anticorps ; si l'on purifie ces extraits alcooliques bruts en éliminant les impuretés non lipidiques, on voit disparaître tout pouvoir antigénique in vivo. Cependant, ces préparations sont très actives in vitro où elles fixent l'alexine en présence des anticorps correspondants. Ces antigènes incomplets, inactifs in vivo, constituent des *haptènes* selon la désignation proposée par Landsteiner.

Dans certains cas, ces haptènes lipoidiques sont actifs à la fois dans la réaction de fixation de l'alexine et dans les réactions de précipitation, mais, nous limiterons nos études aux *haptènes lipoidiques de fixation de l'alexine* ⁽²⁾.

*
**

Nos recherches personnelles ont eu pour objet l'étude de la composition chimique de l'haptène lipoidique de fixation de l'alexine du Bacille tuberculeux. Nos connaissances étant très limitées sur cette matière, il nous a paru intéressant de réunir et d'exposer ici les recherches chimiques effectuées sur les divers haptènes lipoidiques qui, bien que découverts depuis longtemps, sont encore très mal connus. Tandis que l'analyse et la synthèse ont permis d'établir solidement la structure des groupements chimiques responsables de la spécificité des haptènes polysidiques, cependant étudiés plus tard, les très grandes difficultés rencontrées dans la purification de ces substances lipoidiques, et

(2) C'est à dessein que nous employons fréquemment dans ce texte le qualificatif « lipoidique » qui ne définit pas une nature chimique exacte, mais qui indique seulement une ressemblance des propriétés physicochimiques avec celles des lipides. Ce qualificatif convient particulièrement bien aux substances contenues dans ces extraits alcooliques qui renferment, à côté de véritables lipides, de nombreuses impuretés non lipidiques entraînées par adsorption ou par solvation.

dues à des phénomènes de solubilisation réciproque, ont entravé ces recherches et expliquent nos faibles connaissances à leur sujet. Après avoir précisé les données biologiques souvent complexes et confuses de chacun des problèmes immunologiques, nous nous sommes attachée à connaître la nature chimique de ces fractions hapténiques, question qui nous intéresse plus directement. C'est pourquoi nous ne parlerons pas ici des haptènes lipodiques qui ont fait l'objet d'études purement biologiques.

HAPTÈNE DE FORSSMAN

L'étude de l'haptène de Forssman est de beaucoup la plus intéressante tant par les problèmes immunologiques qu'il soulève que par les nombreux travaux chimiques qu'il a suscités et qui, seuls, parmi ceux se rapportant à des haptènes lipoidiques, ont abouti à quelques résultats précis.

Le problème sérologique

En 1911, Forssman (52) publie une série d'expériences démontrant un fait inattendu : la formation d'anticorps lysant les hématies de Mouton à la suite d'injection d'extraits d'organes de Cobaye à des Lapins. A cette époque où la conception de spécificité absolue était encore fort en honneur, cette découverte étonna beaucoup les immunologistes qui l'accueillirent avec scepticisme. Mais bientôt, elle fut confirmée et même étendue à de nouvelles espèces animales : Cheval et Chat. Aujourd'hui Forssman et de nombreux auteurs ont signalé l'existence de ce même antigène, donnant naissance à des hémolysines anti-mouton, chez les espèces animales les plus diverses (Cheval, Porc, Chèvre, Chien, Chat, Hommes appartenant aux groupes sanguins A et AB, Souris blanche, Poule, certains poissons), dans les œufs d'un grand nombre d'oiseaux, dans divers microorganismes (certains types de Bacilles paratyphiques, Bacille de Shiga S, Pneumocoques des types I et III) et même dans quelques végétaux. Cet antigène, au contraire, est absent de certaines espèces voisines des précédentes (Lapin, Rat, Bœuf, Hommes des groupes sanguins B et O, Crapaud, Bacilles typhiques et végétaux en général). On doit cependant noter que, si d'une part cet antigène paraît réparti au hasard parmi les animaux (présence chez le Cobaye et la Souris, absence chez d'autres rongeurs comme le Lapin et le Rat), on constate d'autre part que lorsque l'on étudie un groupe zoologique plus restreint, genre ou famille, il apparaît

homogène (présence dans cinq espèces de Félidés examinés, dans tous les Canidés, absence chez les Primates) (84). Streng (178) propose même d'utiliser cette propriété, en plus des caractères morphologiques, pour établir les relations zoologiques entre diverses espèces animales. Mais, dans une même espèce, on peut voir se former des groupes caractérisés par la présence ou l'absence de cet antigène : Hommes des groupes sanguins A et AB d'une part, Hommes des groupes O et B d'autre part ⁽³⁾.

Hypothèses sur le mécanisme de la réaction entre les hématies de Mouton et les anticorps engendrés par ces substances d'origines diverses.

Comment ces anticorps engendrés par des antigènes d'origine si diverses se combinent-ils aux globules rouges du Mouton ?

Les hématies, on le sait, ont une structure antigénique complexe ; deux substances au moins, ou groupes de substances, interviennent dans la formation des hémolysines lorsqu'on les injecte à une espèce animale étrangère : des substances lipoidiques et des protéïdes. En effet, on obtient des sérums hémolytiques d'une part, par injection de l'extrait alcoolique des hématies (mêlé avec du sérum d'une autre espèce animale) et d'autre part, par injection des stromas épuisés par de l'alcool. L'extrait alcoolique ne contenant pas de protéïdes, on obtient avec celui-ci des anticorps anti-lipoidiques, tandis que les stromas privés de lipides donnent naissance à des anticorps anti-protéïdiques (Landsteiner et Van der Scheer) (98). On peut mettre directement en évidence la présence dans les hématies de Mouton d'un antigène autre que l'antigène de Forssman. En effet, lorsque l'on injecte des globules de Mouton à un Cobaye qui possède lui-même de l'antigène de Forssman, il ne peut pas, suivant la règle générale, former des anticorps vis-à-vis d'une substance qu'il renferme en son sein ; cependant, son sérum contient des hémolysines anti-mouton. Elles se sont donc formées aux dépens d'un antigène autre que l'antigène de Forssman (Brunius) (26).

(3) Dans la littérature scientifique, on qualifie souvent d'hétérogénétiques ou d'hétérophiles ces antigènes ou les anticorps qu'ils engendrent, mais ces adjectifs étant également employés dans leur sens général et pour d'autres réactions, afin d'éviter les confusions nous utiliserons uniquement les termes antigènes et anticorps de Forssman.

Doit-on pour cette raison supposer qu'à chaque anticorps de Forssman corresponde un antigène spécial dans l'hématie de Mouton ? Cette hypothèse émise lors de la découverte des premiers antigènes de Forssmann, pouvait expliquer les quelques réactions hétérogènes connues à cette date ; mais aujourd'hui, il faudrait admettre l'existence d'un si grand nombre d'antigènes partiels, qu'elle ne paraît plus satisfaisante.

Il paraît plus logique de supposer que les hématies de Mouton possèdent une substance de Forssman (ou peut-être plusieurs, mais en nombre restreint) capable de réagir avec les anticorps engendrés par un même antigène commun à tous les produits biologiques dont l'injection provoque la formation d'anticorps de Forssman. Les nombreux travaux de Landsteiner (80) sur les antigènes conjugués artificiels rendent très vraisemblable une telle hypothèse : fixant sur des molécules des protéides sans relation immunologique des groupements chimiques connus, cet auteur démontre qu'une parenté chimique détermine la parenté immunologique des antigènes artificiels. Cette supposition n'entraîne d'ailleurs pas la nécessité d'une identité des antigènes de Forssman, mais seulement la présence, comme dans le cas des antigènes synthétiques, d'un groupement spécifique commun, porté par des molécules différentes.

Définition de l'antigène de Forssman

L'Hématie de Mouton possédant plusieurs antigènes, il n'est pas suffisant de constater la formation d'hémolysines anti-mouton pour affirmer l'existence d'un antigène de Forssman. Dans la littérature immunologique on considère généralement qu'un antigène, pour être du type Forssman vrai, doit engendrer des hémolysines anti-mouton susceptibles d'être totalement fixées par un extrait d'organe de Cobaye. Par exemple, l'antigène contenu dans le rein de Cheval correspond parfaitement à cette définition. Il y a une réciprocité d'action complète entre les antigènes extraits du rein de Cobaye et du rein de Cheval : les hémolysines engendrées par les tissus du Cobaye sont quantitativement fixées par le rein de Cheval et vice-versa. On peut affirmer dans ce cas l'identité sérologique de ces deux antigènes (ce qui d'ailleurs n'entraîne pas une identité chimique).

Mais cette complète réciprocité n'existe pas dans tous les cas. Schiff et Adelberger (167) démontrent que les globules rouges

des Hommes des groupes sanguins A et AB contiennent un antigène de Forssman, car, injectés au Lapin, ils donnent naissance à des hémolysines anti-mouton que l'on peut fixer par des extraits d'organes de Cobaye ; mais cet antigène est incapable de se combiner avec des anticorps correspondant à des antigènes de Forssman vrai. La réaction n'est pas réciproque, il n'y a pas une identité sérologique complète de ces antigènes, mais probablement une ressemblance. Ici également, l'étude des antigènes synthétiques est venue éclairer ce nouveau phénomène montrant qu'une parenté chimique et non une identité pouvait en être la base : un sérum « anti-acide O aminobenzoïque » réagit avec un antigène contenant de l'acide O amino-benzène sulfonique, tandis que le sérum correspondant à ce deuxième produit ne se combine pas avec le premier antigène (80).

L'haptène de Forssman, son rapport avec l'antigène de Forssman, sa transformation en antigène in vivo

En 1913 Doerr et Pick (45) observent que l'antigène de Forssman résiste à l'action de la chaleur, puis Sordelli et Fischer (174), Georgi (58), Friedberger et Suto (57) et Taniguchi (180) montrent que cet antigène n'est pas détruit par l'alcool et qu'il est soluble dans ce solvant. Ces auteurs concluent que l'antigène de Forssman n'est pas de nature protéidique. Mais en réalité, ces extraits alcooliques ne contiennent pas l'antigène complet, actif in vivo, car injectés à l'animal, ils n'engendrent pas d'anticorps. Ils sont actifs seulement in vitro où ils sont capables de fixer l'alexine en présence d'anticorps de Forssman : il renferment *l'haptène de Forssman*.

Dans la nature, cet haptène est à l'état d'antigène actif in vivo ; quelle peut être la constitution de cette molécule antigénique que l'alcool décompose ? Nous ne nous étendrons pas longuement sur cette question, d'ailleurs bien mal connue, désirant nous limiter à l'étude de la fraction hapténique. Cependant, ce problème nous amène à parler d'une propriété fort intéressante de cet haptène, propriété qui est commune à tous les haptènes lipoidiques et qui paraît spécifique de leur caractère lipoidique.

A partir d'un extrait alcoolique contenant de l'haptène de Forssman, Landsteiner (78) (97) reconstitue un antigène de Forssman actif in vivo, par simple mélange de la préparation hapténique (privée d'alcool) avec un protéide provenant d'une

espèce animale différente de l'espèce qui doit former les anticorps (87) (88). Cet antigène artificiel est donc constitué par deux éléments : un élément spécifique, actif *in vitro*, mais inactif *in vivo* : l'haptène, et par un élément activant : le protéide qui confère à l'haptène un pouvoir antigénique *in vivo*. On suppose que l'antigène de Forssman contenu dans les hématies et les tissus est construit sur le même modèle ⁽⁴⁾.

Quel est le rôle de cet élément activant ? Le protéide intervient-il par ses propriétés antigéniques propres, ou sert-il uniquement de « vecteur » (selon l'expression de Sachs) pour l'élément spécifique ? Doerr et Hallauer (44) montrent qu'il n'est pas nécessaire que le protéide soit fourni par une espèce différente de celle qui forme les anticorps. Sa spécificité antigénique propre n'intervient donc pas, mais ce protéide modifié par l'haptène acquiert une nouvelle spécificité et devient alors antigène chez l'animal dont il provient. D'après Gonzalez et Armangué (61), il ne serait même pas utile que l'élément activant soit antigénique par lui-même ; son rôle serait purement physique. Ces auteurs obtiennent un bon antigène par adsorption d'extrait alcoolique de rein de Cheval sur du kaolin ou sur du charbon. Mais Landsteiner et Jacobs (85), après avoir confirmé ces expériences, ne purent les reproduire avec des préparations purifiées (86) (72). Une molécule plus complexe que l'haptène, ou une substance par elle-même inactive comme haptène, est probablement nécessaire à cette transformation en antigène par adsorption par de simples particules minérales.

ETUDE CHIMIQUE DE L'HAPTENE DE FORSSMAN

L'étude chimique de cet haptène que l'on peut extraire de sources si différentes est particulièrement intéressante.

Les travaux effectués sur les antigènes synthétiques permettent, nous l'avons vu, d'expliquer l'existence de réactions sérologiques croisées entre des molécules différentes grâce à la présence d'un groupe spécifique commun. En est-il de même dans la nature ? Les réactions hétérogènes observées avec des substances qui, au premier abord, ne présentent aucun lien peuvent-elles s'expliquer par la présence d'un même groupement chimi-

(4) Il est fort possible que ces deux éléments soient unis dans l'antigène artificiel et dans l'antigène naturel pour former un *cénapse* lipo-protéidique que l'alcool décompose lorsqu'on extrait l'haptène.

que ? L'analyse et la synthèse ont confirmé magnifiquement cette hypothèse dans le cas des polyosides pneumococciques ; c'est ainsi que les réactions du sérum antipneumococcique du type III avec les polyosides du Pneumocoque du type VIII (59), du Gono-coque et du Méningocoque (130), avec la gomme arabique (67), et avec des antigènes artificiels azoprotéïdiques contenant de l'acide glycuronique (60) sont dues à la présence dans toutes ces substances, de molécules d'acide glycuronique.

Dans le cas de l'haptène de Forssman ce processus est-il le même ? Les substances actives extraites de matières si différentes : organes d'animaux, sécrétions (urine, salive, pepsine), microorganismes, possèdent-elles toutes dans leurs molécules, vraisemblablement très différentes, un même groupement déterminant cette spécificité ? Quoique l'on n'ait pas encore établi la nature exacte des fractions spécifiques, les diverses préparations obtenues présentent entre elles un certain nombre de points communs qui rendent cette hypothèse très probable.

Premiers travaux

Meyer, en 1921 (125), constate par un fractionnement des extraits alcooliques des reins de Cheval et de Cobaye par l'acétone que l'activité sérologique se concentre dans la fraction insoluble dans ce solvant, c'est-à-dire avec les phosphatides. Sordelli et Fischer (175), appliquant la méthode de fractionnement de Levene et Rosenheim, à l'extrait alcoolique du rein de Cheval et de Cobaye, obtiennent une préparation très active et possédant les propriétés des cérébrosides. Puis Sordelli, Wernicke et Deulofeu (176) poursuivant ce travail sur le rein de Cheval, obtiennent après divers traitements par des solvants organiques, une préparation soluble dans l'eau et très active (une quantité de 0,0005 mg.⁽⁵⁾ est capable de fixer quatre doses hémolytiques), tandis que les fractions correspondant à la phrénosine et à la cérasine le sont très peu.

(5) Il est très difficile de comparer les activités des préparations obtenues par les divers auteurs, car les méthodes employées ne sont pas identiques (déviations du complément ou technique d'inhibition) ; même lorsque le principe de la méthode est semblable, les modalités d'application diffèrent suivant les auteurs : selon que l'on observe le début de l'hémolyse des globules (Freudenberg) ou l'inhibition totale de l'hémolyse (Brahn et Schiff) on obtiendra des chiffres qui sont dans le rapport de 10 à 1 environ.

Phénomène d'augmentation de l'activité hapténique de la substance spécifique par addition d'une substance aspécifique inactive par elle-même.

En purifiant l'haptène de Forssman contenu dans l'extrait alcoolique du rein de Cheval, Landsteiner et Levene (90) observent une perte considérable de l'activité hapténique. Ces auteurs supposent que l'activité de la substance spécifique est augmentée dans l'extrait total par la présence de composés par eux-mêmes inactifs. En effet, l'addition de sphingomyéline brute extraite du cerveau de Bœuf, substance qui par elle-même est totalement incapable de se combiner avec des anticorps de Forssman, augmente l'activité de certaines de leurs préparations.

Brunius (26) observe un phénomène analogue. En extrayant par de l'acétone-éther une préparation active, il voit disparaître brusquement l'activité dans les deux fractions qu'il a obtenues ; l'auteur suppose donc qu'il a séparé, par cette opération, la substance spécifique d'avec une substance inerte par elle-même, mais indispensable à la réaction. La fraction insoluble dans l'acétone-éther représente l'élément spécifique, car son mélange en proportion convenable, non seulement avec les lipides dont on l'a séparé, mais encore, avec de l'extrait de rein de Bœuf (qui ne contient pas d'haptène de Forssman), fait réapparaître la totalité de l'activité.

Dans ce phénomène d'activation, quel est le rôle de cette substance aspécifique, mais cependant indispensable ? Brunius pense qu'il est purement physique. A ce stade de la purification, la fraction spécifique n'est pas parfaitement soluble dans l'eau dans laquelle elle donne une solution opalescente ; l'extrait de rein de Bœuf conférerait à l'élément spécifique qu'elle renferme, un « degré de dispersion » qui la rendrait apte à se combiner avec les anticorps de Forssman. En effet, Brunius montre que le desoxycholate et le taurocholate de sodium possèdent la propriété de donner avec la préparation purifiée de l'haptène de Forssman (préparation inactive lorsqu'on l'emploie seule) des solutions limpides ; parallèlement, ces substances sont capables de régénérer, comme l'extrait de rein de Bœuf, la totalité de l'activité primitive que possédait cette préparation lorsqu'elle était contenue dans l'extrait alcoolique brut.

Découverte de la présence de glucides dans les préparations hapténiques

Afin d'étudier l'haptène de Forssman, Landsteiner et Levene (90) soumettent l'extrait alcoolique du rein de Cheval à un fractionnement systématique par des solvants organiques. On est frappé par le fait que, au cours de ces opérations, les caractères de solubilité de la fraction active se modifient progressivement. Alors que l'extrait initial est insoluble dans l'eau et soluble dans un grand nombre de solvants organiques, ces auteurs obtiennent finalement une fraction hapténique très active qui est parfaitement soluble dans l'eau et insoluble dans l'alcool, dans l'acétone, dans l'éther et dans le chloroforme. Cette fraction est cependant de nature lipidique, car l'hydrolyse acide en libère des acides gras ; mais on trouve également des oses dans ses produits de dégradation. Cette fraction est bien spécifique, car lorsque ces auteurs soumettent au même traitement le rein de Bœuf qui, on le sait, ne contient pas d'haptène de Forssman, ils n'obtiennent aucun produit (91).

Landsteiner et Levene poursuivent la purification de cette fraction par les solvants organiques et par une précipitation par de la liqueur de Fehling (92) (93). Ils obtiennent des préparations douées d'une activité sérologique très élevée : elles agissent à la dilution de 1/20.000.000 (en présence de cinq parties de sphingomyéline brute). Ces préparations ne renferment plus ni soufre, ni phosphore, mais elles contiennent 2 p. 100 d'azote. Elles sont solubles dans l'eau, dans les alcalis dilués et dans la pyridine, mais elles sont insolubles ou à peine solubles dans la plupart des solvants organiques. Lorsque l'on compare la composition de ces préparations à celle de la sphingomyéline, on constate que leur teneur en carbone (50 p. 100) est nettement inférieure, tandis que leurs teneurs en oses (28 p. 100) et en acides gras sont plus élevées. Landsteiner ayant obtenu des préparations riches en glucides conclut ainsi : « quoique l'on ne puisse pas prétendre avoir des substances homogènes, ces observations suggèrent que les groupements spécifiques seraient de nature glucidiques, et, elles laissent présumer l'importance des osides dans la spécificité des haptènes d'origine animale en général ».

Cependant, il existe une différence nette entre les polysides spécifiques extraits des microorganismes et ceux contenus dans ces préparations : par simple mélange avec des protéides, ces

derniers deviennent des antigènes actifs *in vivo*, tandis que cette transformation ne se produit pas avec les polyosides bactériens. Ce phénomène est probablement dû au fait que, dans ces préparations provenant d'extract d'organe, les osides sont vraisemblablement liés à des acides gras, cette nature lipidique qui explique déjà l'extractibilité des osides par l'alcool, explique peut-être aussi leur capacité d'union avec des protéides pour former des antigènes actifs *in vivo*.

A l'aide de techniques d'adsorption et d'élution utilisées surtout dans l'étude de l'haptène de Wassermann, Weil et Berendes (189) purifient l'haptène de Forssman contenu dans l'extract alcoolique du rein de Cheval. Ils obtiennent, après adsorption sur du kaolin, directement, une préparation soluble dans l'eau en éluant la substance active par ce solvant. Mais ces résultats n'ont pas pu être confirmés par Brunius (25). Nous verrons à propos de l'haptène de Wassermann, que de tels résultats, en apparence contradictoires, sont fréquents lorsque l'on emploie de telles techniques.

Combiesco (32) aborde l'étude de l'haptène de Forssman du rein de Cheval et de Cobaye par une autre voie. Se basant sur les conclusions de Landsteiner il applique à ces deux matières premières les méthodes d'obtention des polyosides : 1° par l'acide acétique (selon Bruce White), et 2° par l'antiformine⁽⁶⁾ (selon Furth et Landsteiner). Les préparations obtenues sont solubles dans l'eau ; elles sont privées de protéides et elles sont riches, naturellement, en polyosides dont une grande quantité doit être inactive. Il est cependant intéressant de constater que ces préparations sont actives comme haptène de Forssman ; cet haptène peut donc accompagner soit les lipides, soit les glucides suivant la méthode d'extraction employée.

Ces études, directement dirigées vers les polyosides, nous conduisent à parler d'une série de recherches sur la substance spécifique A des groupes sanguins humains A et AB.

(6) L'antiforme s'obtient en mélangeant en parties égales une solution de soude à 15 p. 100 et la solution suivante : carbonate de sodium : 60 g., chlorure de calcium sec : 40 g., eau distillée : 4.000 cm³.

Travaux sur la substance spécifique A des hématies des hommes des groupes sanguins A et AB

Schiff et Adelsberger (166) en 1924 établissent la relation sérologique entre la substance A contenue dans les hématies des Hommes des groupes sanguins A et AB et l'haptène de Forssman. On peut extraire cette substance spécifique A du sang ou des organes humains par l'alcool ; mais les difficultés rencontrées lors de la purification de ces préparations lipoidiques n'a pas permis d'obtenir de renseignements précis sur sa nature chimique exacte (Landsteiner et V. der Scheer (99), Witebsky (197), Lattes) (102). Brahn et Schiff (18) l'ayant également obtenue sous une forme hydrosoluble et insoluble dans l'alcool, Schiff interprète ces différences de solubilité qu'accompagnent des différences légères entre les propriétés sérologiques, par une combinaison de la substance spécifique hydrosoluble avec des lipides qui lui confèrent son alcool-solubilité.

L'étude chimique de cet haptène a été considérablement facilitée par le fait qu'on le retrouve en abondance sous une forme hydrosoluble dans un certain nombre de sécrétions : salive, urine, suc gastrique (Yamakami (199), Yosida (200), Brahn et Schiff (18) (19)). Brahn et Schiff, qui les premiers travaillèrent sur ce sujet, décrivent des préparations très actives obtenues à partir de l'urine et de la pepsine commerciale. Ces préparations ne contiennent pas de protéides, mais on peut mettre en évidence la présence d'oses après hydrolyse acide (20). Dans la substance extraite de la pepsine, ils démontrent la présence de galactose et soupçonnent celle d'un ose aminé.

Landsteiner (79) s'adresse à la salive de Cheval comme source de substance spécifique A. Combinant des purifications par adsorption et élution avec des précipitations répétées par l'acétone, l'alcool et l'acide acétique glacial à partir de la solution du produit dans de l'eau acidifiée, il obtient une fraction qui possède une activité sérologique considérable, et même surprenante : des doses de 0,000025 à 0,0005 γ (2,5 à $5 \cdot 10^{-10}$ g) sont suffisantes pour inhiber l'hémolyse des hématies de Mouton (selon la technique de Freudenberg). Cette fraction donne une solution visqueuse dans l'eau ; elle ne contient pas de protéides et libère par hydrolyse acide 57 p. 100 d'oses et 10 p. 100 de groupes acétyles. Elle contient des pentoses, du galactose et de la glucosamine, mais elle ne renferme pas d'acide uronique.

Employant des techniques analogues, Landsteiner et Chase (82) extraient, à partir de la pepsine commerciale, une substance qui présente une activité hapténique comparable à celle de la fraction précédente extraite de la salive. Cette substance libère également par hydrolyse des oses (mais en plus grande quantité : 70 p. 100) et des groupes acétyles : 10 p. 100. Comme la fraction extraite de la salive, elle contient du galactose, de la glucosamine et pas d'acide uronique, mais elle ne renferme pas de pentose ; elle donne également une solution visqueuse dans l'eau.

Etude de l'haptène de Forssman extrait des microorganismes

Le rapprochement de l'haptène de Forssman d'avec les polyosides se précise encore lorsque l'on étudie les haptènes extraits des microorganismes : polyosides spécifiques de l'espèce microbienne et haptène de Forssman paraissent s'identifier en une seule et même molécule.

Appliquant la méthode d'extraction des polyosides bactériens par l'antiformine de Furth et Landsteiner, Meyer (97) isole du Bacille de Shiga, après des précipitations alcooliques, une substance sérologiquement active. D'une part, elle inhibe totalement à la dose de 0,2 γ l'hémolyse des hématies de Mouton par le sérum anti-Shiga ; d'autre part, elle présente une forte activité comme haptène de déviation et de précipitation avec le même sérum anti-Shiga, même lorsque l'on a privé ce sérum des anticorps de Forssman par adsorption sur des hématies de Mouton. Malgré diverses tentatives, Meyer ne parvient pas à séparer ces deux activités sérologiques.

Purifiant la fraction polyosidique du Bacille de Shiga S, Morgan (131) obtient une préparation qui libère par hydrolyse acide 92 p. 100 d'oses, qui contient 1,6 p. 100 d'azote, du galactose et un amino-hexose acétylé, mais qui ne renferme ni pentose, ni acide uronique. Meyer et Morgan (129) étudient les propriétés sérologiques de cet haptène dont 0,1 γ inhibe totalement l'hémolyse des hématies du Mouton. Comme précédemment, ces auteurs, malgré de multiples tentatives de fractionnements de leur préparation ou d'adsorption sérologique, n'arrivent pas à séparer les deux activités immunologiques qui évoluent toujours parallèlement. Ils concluent que ces deux activités sont liées à deux groupements spécifiques portés par une même molécule et capables

de réagir chacun avec son anticorps propre. Cette hypothèse est fort plausible, l'étude des antigènes synthétiques ayant démontré qu'une seule substance pouvait engendrer plusieurs anticorps. Les travaux sur ce sujet sont nombreux, nous ne citerons que le plus récent qui est le plus démonstratif. Landsteiner et Van der Scheer (140) préparent des azoprotéides avec des composés azoïques possédant deux groupes sérologiquement actifs ; par immunisation avec de tels antigènes, ils obtiennent des immunsérums contenant deux anticorps distincts, chaque anticorps étant spécifique pour l'un des deux groupes et pouvant être séparé de l'autre par adsorption sérologique sélective.

Witebsky, Neter et Sobotka (198) montrent qu'il existe une relation sérologique entre le polyoside acétylé spécifique du pneumocoque S type I isolé par Heidelberger, Avery et Goebel (66) (68) (8) et la substance spécifique A des groupes sanguins humains. Ce polyoside qui donne une solution visqueuse dans l'eau, libère par hydrolyse acide 32 p. 100 d'oses ; ils contiennent de l'azote aminé et 6 p. 100 de groupes acétyles (vraisemblablement liés à des hydroxyles et non aux fonctions amines), des osamines et un peu d'acide uronique. Ici aussi, les auteurs ont essayé vainement de séparer les deux activités sérologiques qui doivent être portées par une même molécule.

Preuves indirectes en faveur de la nature osidique du groupement spécifique de l'haptène de Forssman. Importance des radicaux acétylés

Les résultats analytiques que nous venons d'exposer, bien qu'ils soient encore incomplets, sont très en faveur de la nature osidique du groupement spécifique de l'haptène de Forssman. Quelques preuves indirectes viennent s'ajouter à ces données directes, et confirmer cette conception.

Landsteiner et Chase (81) montrent que des microorganismes qui possèdent la particularité d'attaquer les polyosides bactériens (tel le *Myxobactérium* de Morgan et le *Saccharo bacterium* ovale décrit par Sickles et Shaw) sont capables de détruire l'activité sérologique de l'haptène A extrait de la salive de Cheval et de la pepsine commerciale. Meyer et Morgan (129) voient disparaître simultanément, sous l'action de ces mêmes microbes, la double activité sérologique (haptène A et haptène spécifique bactérien) du polyoside qu'ils ont isolé du Bacille de Shiga.

Les groupements acétyles liés au polyoside extrait du Pneumocoque sont indispensables à son activité comme haptène A ; en effet, ce polyoside, après désacétylation par un alcali froid, n'est plus capable d'inhiber l'hémolyse des hématies de Mouton (198). Freudenberg (55) (56) observe les mêmes faits avec les haptènes de Forssman extraits de l'urine des Hommes des groupes sanguins A et AB, et des organes du Porc et du Bœuf ⁽⁷⁾. Il démontre de plus que cette disparition de l'activité sérologique est due uniquement à la perte des groupes acétyles, car il régénère le pouvoir hapténique des préparations désacétylées en les réacétylant par du cétène.

Travaux de Brunius

En se basant sur les résultats antérieurs obtenus dans l'étude de l'haptène de Forssman et de la substance spécifique A, Brunius (26) reprend l'étude de l'haptène de Forssman du rein de Cheval en l'abordant par deux voies ; il étudie les préparations osidiques et lipoidiques extraites de cette même matière première. Nous ne donnerons de ce travail considérable conduit avec méthode et rigueur, qu'un bref schéma et les résultats auxquels il aboutit.

Après plusieurs essais d'extraction plus ou moins fructueux, avec des solutions aqueuses diverses, Brunius obtient, à l'aide d'antiformine, un extrait très actif comparable aux préparations osidiques obtenues à partir des microorganismes. Il purifie cet extrait par précipitation au moyen d'acide acétique, puis il élimine les substances solubles dans l'acétone en milieu acide. Il extrait la substance active par de l'alcool et il obtient une préparation soluble dans l'eau, privée de protéïdes et donnant intensément des réactions des polyosides. Ayant employé cette technique, l'auteur pensait avoir séparé d'avec des lipides une fraction purement osidique ; il n'en est rien, car cette préparation, si soluble dans l'eau, l'est également presque intégralement dans l'alcool absolu. Elle est probablement de nature lipidique ⁽⁸⁾.

(7) Nous sommes étonnée que cet auteur ait extrait une préparation active des organes du Bœuf qui d'après d'autres auteurs ne renferme pas d'haptène de Forssman.

(8) Le fait de trouver des lipides dans les préparations osidiques n'est pas réservé aux seuls haptènes lipoidiques. Heideberger et Menzel (70) voient se séparer à partir des polyosides du Bacille tuberculeux, du palmitate de magnésium sous l'action de la soude,

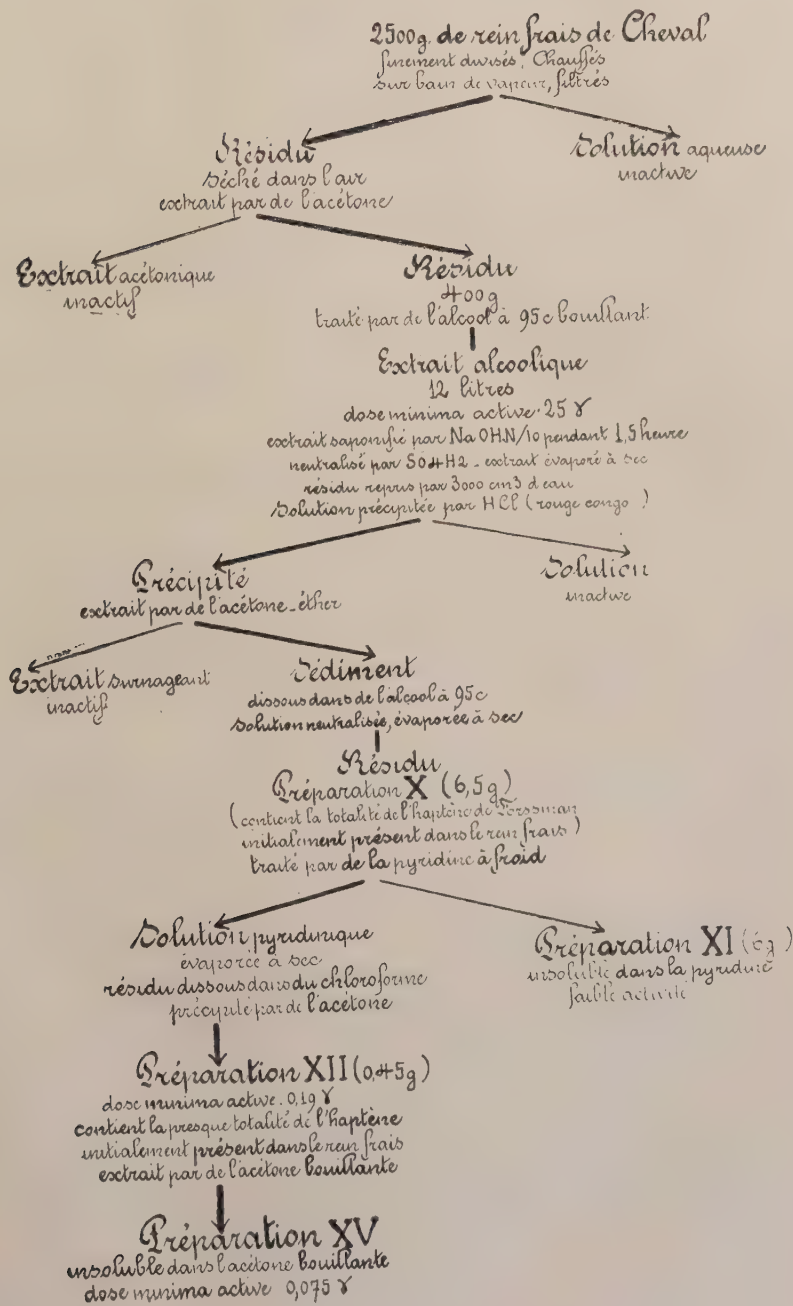
Cette méthode n'ayant pas conduit à une préparation purement osidique comme dans le cas des microorganismes, Brunius l'abandonne et s'adresse alors à l'extrait lipodique du rein de Cheval. (Les opérations qui suivent sont schématisées dans le tableau I, page 31). Après élimination de lipides acétono-solubles, le rein est extrait par de l'alcool bouillant. La résistance de la substance hapténique aux alcalis a permis à l'auteur de réaliser une purification rapide et énergique par élimination des glycérides restant et des phosphatides. L'extrait alcoolique total est saponifié par de la soude alcoolique N/1 à l'ébullition pendant 1 h. 30. Après neutralisation de la soude par de l'acide sulfurique, et séparation du sulfate de sodium insoluble dans l'alcool, on dissout le résidu d'évaporation de la solution alcoolique dans de l'eau. Les savons formés aux dépens des acides gras, donnent une solution visqueuse contenant également l'haptène de Forssman. Par acidification, on précipite la substance active avec les acides gras inertes que l'on sépare facilement en les dissolvant dans un mélange d'acétone et d'éther. Le résidu insoluble dans l'acétone-éther renferme la totalité de l'activité initiale. On dissout ce résidu dans de l'alcool à 95°, puis on le neutralise par de la soude. Le traitement de ce produit par de la pyridine permet d'extraire 92 p. 100 de substances sensiblement dépourvues d'activité (préparation XI). La petite quantité de matière soluble dans la pyridine froide précipitée de sa solution chloroformique par de l'acétone (préparation XII) renferme la presque totalité de l'activité hapténique contenue dans le rein frais. L'haptène est alors concentré dans une masse de substances 6.000 fois plus faible que la masse du rein frais. L'extraction de cette préparation XII par de l'acétone bouillante permet encore d'en doubler l'activité (préparation XV). Il suffit d'employer 0,075 γ de cette préparation pour inhiber totalement l'hémolyse des hématies de Mouton (technique d'inhibition de Brahn et Schiff) ; la substance agit alors dans un milieu où elle est diluée à 1/20.000.000.

L'auteur ne prétend pas avoir obtenu l'haptène à l'état de molécule pure, aussi étudie-t-il la composition chimique des diverses préparations séparées au cours des purifications, en fonction de leur activité sérologique. Les teneurs en carbone, hydrogène, azote, phosphore et soufre, ne donnent pas de renseignements intéressants, si ce n'est que ces teneurs ne correspondent pas du tout à la composition des cérébrosides auxquels on avait

Tableau I

Purification de l'haptène de Drossman contenu dans l'extrait alcoolique de rein de Cheval

d'après Drossman



autrefois attribué l'activité. L'hydrolyse acide libère une substance insoluble dans l'eau et qui contient vraisemblablement des acides gras de haut poids moléculaire (38 p. 100 environ pour la préparation XV) : la préparation hapténique est donc de nature lipidique. L'hydrolyse acide libère également des oses en grande quantité, de 25 à 30 p. 100. La nature exacte de ces oses n'a pas été déterminée ; ils ne contiennent ni pentoses, ni acide glycuronique, mais seulement des aldohexoses et une osamine dont la fonction amine est probablement acétylée. Cette dernière substance est particulièrement intéressante, car il y a une relation remarquable entre l'activité des préparations comme haptène de Forssman et leur teneur en ose aminé : plus l'haptène est concentré dans ces préparations, plus la teneur en ose aminé est élevée. L'osamine semble donc être un constituant de la molécule de l'haptène.

Conclusion. — Lorsque l'on compare les diverses préparations d'haptène de Forssman et de substance spécifique A obtenues à partir de produits biologiques très différents, on constate que ces préparations possèdent des constituants communs ; toutes celles qui ont été étudiées chimiquement ont révélé la présence d'osamine et de groupes acétyles. Il semble donc que l'on puisse conclure avec Brunius, de ce faisceau de résultats, que l'osamine et les groupes acétylés (peut-être même la N acétylglucosamine) représentent le groupe spécifique de l'haptène de Forssman et de la substance A. La présence de ce même groupe spécifique dans des produits qui, au premier abord, ne présentent aucune ressemblance, permet de comprendre et d'expliquer l'existence de leurs relations sérologiques.

Travaux de Freudenberg

Mais cette hypothèse, si attrayante, n'est pas en accord avec les résultats obtenus par Freudenberg (55) pour la substance spécifique A extraite de l'urine d'Hommes du groupe sanguin A. Après élimination d'une grande quantité de substances inactives par de l'acétate de plomb et du tannin, cet auteur précipite la substance active par de l'hydroxyde de plomb ammoniacal. Après purification par des précipitations alcooliques successives, il obtient un produit très actif (inhibition nettement positive à la dose de 0,01 à 0,005 γ), aisément soluble dans l'eau, mais pratiquement insoluble dans les solvants organiques. Cette pré-

paration libre, par hydrolyse acide, 45 à 50 p. 100 d'oses parmi lesquels on a pu identifier du galactose, de la glucosamine, et de l'acide glycuronique ; elle contient également 9,5 p. 100 de groupes acétyles. Cette composition rappelle celle des préparations isolées par les autres auteurs, et il semble donc que ces résultats viennent confirmer les conclusions de Brunius. Mais Freudenberg appliquant le même traitement à l'urine d'individu des groupes sanguins O et B, obtient des substances ayant des propriétés et des compositions chimiques semblables à celles de la préparation extraite à partir de l'urine des individus du groupe A ; or nous savons que seuls les produits d'origine A contiennent de l'haptène de Forssman.

Poursuivant ces purifications, cet auteur (56) concentre cinq fois l'activité de sa préparation. A partir de 100 l. d'urine, il obtient 0,15 g. d'une substance qui renferme du galactose et de l'azote acétylé, mais qui ne contient plus ni acide uronique, ni acétyl glucosamine. La préparation obtenue à partir d'urine du groupe O est chimiquement différente, mais elle contient encore des groupes acétyles. A partir d'organes de Bœuf et de Porc, Freudenberg isole une substance encore plus active (début d'inhibition avec 0,0005 γ) et possédant une composition analogue à la précédente. Nous avons déjà mentionné le rôle important des groupes acétyles, l'activité sérologique disparaissant par action des alcalis pour réapparaître lorsqu'on réacétyle par du cétène, le produit désacétylé.

Nouvelles conclusions. — D'après ces nouveaux travaux, il semble qu'il faille abandonner l'hypothèse de Brunius faisant de l'acétylglucosamine le groupement spécifique de ces haptènes d'origines multiples. On constate d'ailleurs, d'une part, que le galactose a été caractérisé dans toutes les préparations actives où on l'a cherché, et d'autre part, que les groupements N acétyles ont un rôle indéniable (sans que leur présence soit une raison suffisante pour constituer un haptène de Forssman) ; il est donc possible que l'association du galactose et de groupes N acétyles représente le groupement spécifique de l'haptène de Forssman ⁽⁹⁾.

(9) D'après Jorpes (74), la substance spécifique A contenue dans l'urine humaine serait de nature protéidique. On peut supposer qu'il existe plutôt dans ce liquide une association de la substance A avec un protéide.

On voit les énormes difficultés qu'ont rencontrées les savants qui ont étudié l'haptène de Forssman. Ces difficultés proviennent de la complexité du phénomène sérologique et surtout du fait que cette activité hapténique considérable est supportée par une infime quantité de substance noyée dans une énorme masse de produits inertes. Lorsque l'on s'adresse à des extraits lipoïdiques, les phénomènes de solvation réciproques gênent considérablement les fractionnements. Mais ici, grâce à la résistance de l'haptène aux alcalis, cet obstacle a pu être détourné et l'on est parvenu à obtenir des préparations lipoïdiques ayant un pouvoir hapténique du même ordre de grandeur que les préparations polyosidiques les plus purifiées.

Ces travaux ne sont pas encore arrivés à leur terme et la connaissance exacte du groupe spécifique de l'haptène de Forssman demande encore des confirmations d'ordre analytique et synthétique. Cependant on peut déjà, à l'heure actuelle, tirer de ces études des conclusions intéressantes.

CONCLUSIONS

1. — Les propriétés sérologiques communes aux divers haptènes de Forssman peuvent s'expliquer par la présence, dans ces produits d'origines si diverses, d'un groupement spécifique commun (ou peut-être de groupements présentant une parenté chimique étroite).

2. — Ce groupement spécifique est de nature osidique puisque des préparations purement polyosidiques sont actives. Il n'est actif qu'à l'état acétylé ; ces groupes acétylés seraient fixés sur des fonctions aminées. Le galactose seraient également un facteur de cette spécificité.

3. — Ce groupement spécifique peut être porté par des molécules différentes : polyosides (Bacille de Shiga, Pneumocoque, salive, urine, pepsine), lipides (organes animaux) et même peut-être protéïdes (urine). De ce fait, les divers haptènes de Forssman peuvent avoir des propriétés très différentes, et présenter des activités sérologiques inégales même à l'état de molécules chimiques pures.

4. — Une même molécule peut être le support de plusieurs groupes spécifiques : haptène de Forssman et haptènes bacté-

riens des polyosides du Bacille de Shiga et du Pneumocoque type I.

5. — Seuls les haptènes de Forssman du type lipoïdique sont capables de devenir des antigènes in vivo par simple mélange avec un protéide ; les haptènes de Forssman présentant une constitution purement osidique, ne possèdent pas cette propriété.

HAPTÈNE DE WASSERMANN

Tandis que l'haptène de Forssman, dont l'intérêt est purement théorique, a suscité de très nombreuses recherches chimiques, l'haptène de Wassermann, malgré son grand intérêt pratique, est encore à l'heure actuelle peu étudié du point de vue chimique.

Le problème sérologique

En 1906, Wassermann, Niesser et Bruck (188) appliquent la réaction de déviation du complément de Bordet et Gengou au diagnostic de la syphilis en utilisant comme antigène un extrait de foie de fœtus hérédosyphilitique, où pullulent les Tréponèmes. Ayant obtenu des résultats positifs, ces auteurs pensent qu'ils observent là une classique fixation de l'alexine par le complexe résultant de l'union d'une sensibilisatrice antimicrobienne présente dans le sérum syphilitique, avec son antigène, les Tréponèmes contenus dans le foie hérédosyphilitique. L'année suivante, Marie et Levaditi (120) montrent que le mécanisme de la réaction est en réalité, tout autre, car ils remplacent, sans modifier aucunement les résultats, l'extrait de foie syphilitique par un extrait de foie normal. Seuls les sérums syphilitiques fixent l'alexine en présence de cet antigène ; la réaction est spécifique de cette affection, mais on ne peut plus l'attribuer à l'interaction d'une sensibilisatrice et d'un antigène spirochètiens.

Nous ne voulons pas discuter ici en détail les nombreuses hypothèses émises pour expliquer cette réaction atypique ; désirant nous limiter à l'étude chimique de l'haptène, nous citerons seulement les principales.

Certains auteurs⁽¹⁰⁾ prétendent que cette fixation de l'alexine n'a rien de commun avec la réaction de Bordet et Gengou.

(10) *Revue des théories physicochimiques*, par Einstein et Paul (47).

Le sérum des syphilitiques ne contiendrait pas de véritable anticorps, mais grâce à un « déséquilibre colloïdal » mis en évidence par des réactions de floculations spéciales (de Sachs-Georgi, de Vernes, de Kahn, etc....) il serait capable de former, avec les colloïdes de l'émulsion de l'antigène, un complexe qui aurait la propriété d'absorber l'alexine. Ces mots ne font que voiler notre ignorance et d'autre part, on a observé que toutes les floculations ne s'accompagnent pas de la fixation de l'alexine.

D'autres auteurs pensent que ces sérums pathologiques contiennent bien une véritable sensibilisatrice. Ils supposent que l'antigène n'est pas le spirochète, mais un constituant même de l'hôte infecté. Sous l'action du tréponème, ce constituant serait libéré dans l'organisme et engendrerait des auto-anticorps, peut-être grâce à l'action combinée des protéides du spirochète qui apporterait ainsi l'élément hétérogène. En effet, si l'on injecte à des lapins des extraits d'organes antigéniques *in vivo* (Merkens (122) ou des préparations hapténiques (pouvant même avoir été extraites à partir d'organes de Lapin), mais que l'on a mélangées à du sérum de porc pour les rendre antigéniques *in vivo* (Sachs) 157), on obtient des sérums expérimentaux qui possèdent toutes les propriétés sérologiques des sérums syphilitiques.

Enfin, il est possible qu'il existe une communauté d'antigène entre le spirochète et les extraits d'organes. Sachs (154) met en évidence une relation sérologique entre l'extrait de cerveau et des cultures de spirochètes, et Klopstock (75) et Ninni (140) obtiennent par injection de spirochètes et de trypanosomes des sérums donnant des réactions de Wassermann positives. Mais inversement, Noguchi (141) constate que les extraits de spirochètes cultivés *in vitro* ne manifestent aucune activité hapténique en présence de sérums humains syphilitiques.

On sait d'ailleurs que la réaction de Wassermann n'est pas rigoureusement spécifique de la syphilis, des réactions positives ont été signalées avec des sérums d'hommes atteints de pian, de lèpre, avec des liquides céphalorachidiens de sujets souffrant de la maladie du sommeil et avec des sérums d'animaux infectés par le trypanosome de la dourine ⁽¹¹⁾.

En réalité, ces diverses théories émises pour tenter d'expliquer cette réaction atypique, ne sont pas très satisfaisantes et

(1) D'après Bordet (14), page 443.

aucune d'entre elles n'a été ni totalement confirmée, ni entièrement infirmée.

Quoiqu'il en soit, le mécanisme de la fixation de l'alexine dans la réaction de Wassermann est analogue à celui que l'on observe dans la classique réaction de Bordet et Gengou ; nous étudierons donc l'haptène de Wassermann sans préciser la nature et l'origine de la substance contenue dans les sérums syphilitiques et avec lequel il entre en jeu.

Nature chimique de l'haptène de Wassermann

Indépendamment les uns des autres, Landsteiner, Mueller et Poetzl (95), Porges et Meier (147), Levaditi et Yamamouchi (103), Weil et Braun (193) observent que l'haptène de la réaction de Wassermann est soluble dans les solvants des lipides, et aujourd'hui il est bien établi que les extraits lipoidiques d'organes d'animaux ou d'hommes normaux sont d'excellents haptènes pour cette réaction. Tribondeau (182 bis) a même utilisé avec succès un extrait éthéré de farine de pois.

Il semble que des substances très différentes soient susceptibles de jouer le rôle d'haptènes en présence de sérum syphilitique, tels les savons, les sels biliaires (169) (103), certains mélanges de lécithine et d'oléate de sodium (155), mais ces haptènes sont peu spécifiques et peu actifs. Ils possèdent, en outre, un fort pouvoir anticomplémentaire, quelquefois voisin de la dose minima nécessaire à la réaction, ce qui rend leur utilisation très peu pratique.

Noguchi (141) reconnaît que parmi les lipides contenus dans les extraits d'organes, seule la fraction insoluble dans l'acétone, c'est-à-dire les phosphatides bruts, est active ; cependant cette activité n'est pas due à la lécithine, mais à quelqu'autre substance qu'il est très difficile d'en séparer. Dudgeon et Mac Lean (118) obtiennent des préparations très actives et pratiquement privées de lécithine.

Depuis, de nombreux auteurs ont essayé de préciser la nature chimique de cet haptène. Une série de travaux est basée sur des techniques d'adsorption et d'élution qui ont permis d'obtenir des préparations très actives, mais peu de renseignements précis sur leur constitution chimique. Ces auteurs, Weil et Ritzenthaler (195), Merckens (123), Klopstock et Misawa (76), Balbi (9), adsorbent tantôt les substances inactives, tantôt la partie active

des extraits alcooliques sur du kaolin, de l'hydroxyde d'aluminium, du charbon..... etc. en opérant en milieu aqueux ou organique ; la substance est ensuite éluee soit par de l'eau (pure ou salée), soit par des solvants organiques les plus divers (alcool, benzène, éther, etc....). Suivant la règle générale, l'adsorption et l'élution dépendent, d'une part, de l'adsorbant (de faibles différences dans la préparation de l'hydroxyde d'aluminium, par exemple, peuvent changer totalement les résultats), d'autre part, de la nature et de la réaction du milieu dans lequel se font ces opérations. Mais ici, comme on opère avec des mélanges très complexes et variables, l'adsorption et l'élution de l'haptène de Wassermann sont, en outre, fortement influencées et même déterminées par la nature des substances inactives qui l'accompagnent ; ce phénomène est si marqué que l'on voit ces propriétés se modifier du tout au tout au cours d'un même fractionnement. On ne peut pas dire, par exemple, que l'haptène de Wassermann est adsorbable par le kaolin en milieu alcoolique et éluable par le benzène, mais seulement que l'activité sérologique contenue dans un extrait de cœur de bœuf préparé de telle manière est adsorbé par un poids déterminé de kaolin présentant telles caractéristiques et qu'elle est éluee par un volume donné de benzène bouillant. Ces multiples facteurs, dont la moindre modification peut entraîner de profonds changements, expliquent les résultats en apparence contradictoires, obtenus par les divers auteurs dans l'étude de cet haptène et des autres haptènes lipoïdiques. Ces techniques permettent une purification rapide des extraits bruts. Weil et Berendes (190) éliminent ainsi, par une seule opération, 75 p. 100 de substances inactives et ils obtiennent une préparation soluble dans l'eau, d'où ils concluent que l'haptène de Wassermann est une molécule hydrosoluble. Mais l'on ne peut pas poursuivre longtemps la purification par des adsorptions répétées, car si l'adsorption et l'élution sont encore possibles on ne fractionne plus la substance. Parfois l'adsorption des préparations très actives n'est même plus possible ; ou bien si l'adsorption est encore réalisable, c'est l'élution qui ne l'est plus (ces phénomènes s'observent aussi bien avec l'haptène de Wassermann qu'avec celui de Forssman).

Les travaux basés sur l'étude systématique des lipides contenus dans les extraits alcooliques d'organes sont plus intéressants du point de vue chimique, quoiqu'ils n'aient conduit qu'à des résultats négatifs. Weil et Ritzenthaler (194) démontrent que,

dans l'extrait alcoolique de cœur de bœuf, l'activité hapténique n'est liée à aucun des lipides connus. Ils éliminent la lécithine et la céphaline en les précipitant par du chlorure de cadmium, puis le cholestérol grâce à sa solubilité dans l'acétone. L'activité sérologique se concentre dans le reste inconnu qui n'est pas un cérébroside, car l'hydrolyse ne libère pas d'oses. Ce produit actif est soluble dans les solvants organiques habituels ; il ne contient plus que très peu d'azote, pas de soufre, mais par contre du phosphore sous forme de radical phosphorique. Son activité est considérable (1 γ suffit pour fixer l'alexine en présence de sérum syphilitique), mais elle est détruite par saponification en milieu aqueux ou alcoolique.

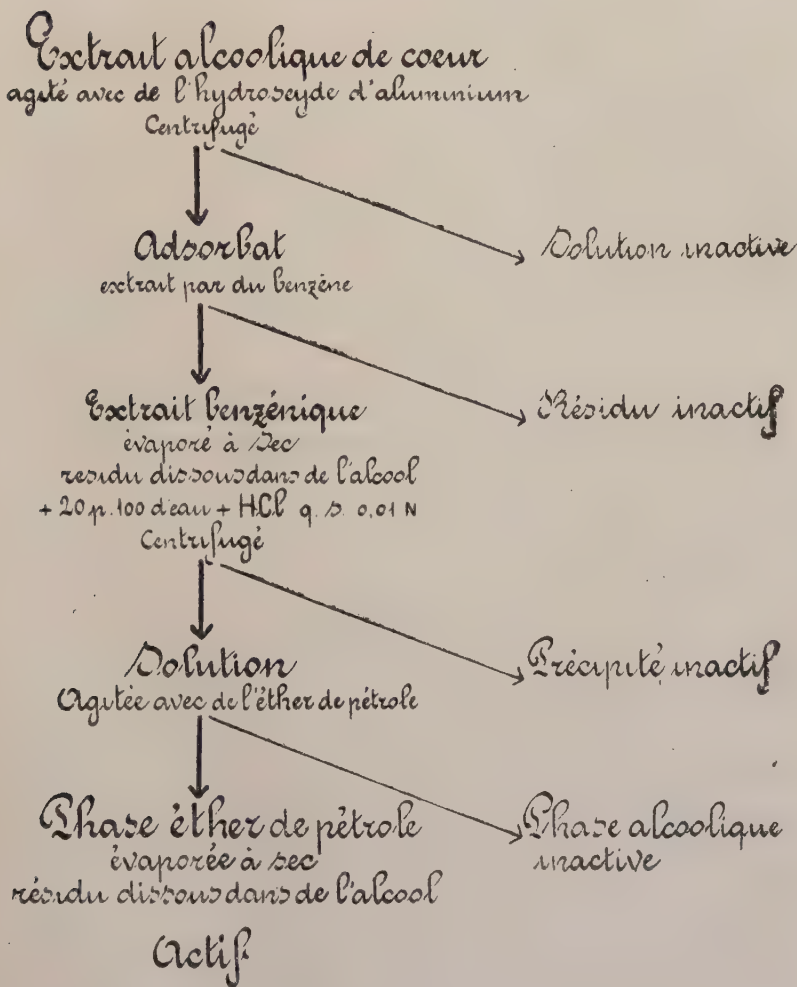
Fischer O. (50) (49) associe les techniques de purification par adsorption et élution aux méthodes utilisées dans l'étude de l'haptène de Forssman. (Les opérations qui suivent sont schématisées dans le tableau II, page 41). Ayant éliminé au préalable une grosse quantité de lipides inactifs par traitement du cœur de Bœuf par le chloroforme, il obtient un extrait alcoolique déjà très actif. L'haptène adsorbé sur l'hydroxyde d'aluminium est élué par le benzène. La substance contenue dans l'extrait benzénique est dissoute dans de l'alcool à 80 c., d'où l'on précipite des matières inactives par acidification avec de l'acide chlorhydrique 0,01 N ; à partir de cette solution alcoolique, on extrait par de l'éther de pétrole la totalité de l'activité qui se trouve concentrée dans une masse de substance cent fois plus faible que dans l'extrait alcoolique brut. L'auteur ne donne que peu de renseignements sur les propriétés chimiques de sa préparation purifiée ; elle ne réduit pas la liqueur de Fehling, ni le ferrieyanure de potassium, elle donne une réaction positive avec la fuschine bisulfitée et une réaction négative avec l'acide diazobenzène sulfonique.

D'après Sakakibara (161), l'haptène de Wassermann serait l'isomère β , optiquement inactif, de la lécithine ; les extraits d'organes riches en β lécithine sont très actifs par rapport aux extraits d'organes qui en contiennent peu, mais, quelle que soit leur provenance, ces β lécithines isolées sont toutes très actives. Ces résultats, s'ils sont confirmés, sont très intéressants, car c'est le seul exemple d'haptène naturel purement lipidique. Mais ils sont en contradiction avec les travaux des auteurs précédents et en particulier ceux de Weil et Ritzenthaler (194) : le précipité chlorocadmique de l'extrait alcoolique de cœur de Bœuf, préci-

Tableau II

Purification de l'haptène de Wassermann

d'après O. Fischer



pité qui contient, on le sait, les isomères α et β de la lécithine, n'est pas actif ⁽¹²⁾.

Ces résultats contradictoires ne permettent pas de tirer, à cette date, de conclusions précises sur la nature chimique de l'haptène de Wassermann ; seuls les résultats négatifs sont acquis.

Avec l'haptène de Wassermann, on observe également des phénomènes d'activation par des substances aspécifiques. Sachs (158), Browning (24), Desmoulière (36), Schmidt (168), Franck (53), étudient l'augmentation de l'activité hapténique des extraits alcooliques par addition d'une petite quantité de cholestérol, substance qui, par elle-même, est inactive comme haptène. Fischer et Gunsberger (50) activent considérablement (jusqu'à 600 fois) leur préparation purifiée par addition de toute une série de substances (y compris des graisses neutres et des carbures d'hydrogène) possédant des propriétés physico-chimiques communes. Nous avons rencontré un phénomène analogue lors de l'étude de l'haptène de Forssman ; mais ici, il ne peut pas être interprété par une solubilisation de l'élément spécifique, mais plutôt par l'action de suspensions colloïdales totalement aspécifiques, étant donné la nature des substances introduites.

Les extraits alcooliques bruts possèdent des propriétés antigéniques *in vivo* qui disparaissent lorsque l'on purifie l'haptène qu'ils contiennent. Mais, comme avec les autres haptènes lipodiques, il suffit de mélanger les préparations hapténiques avec du sérum de porc pour obtenir un excellent antigène *in vivo* (Merkens) (122).

CONCLUSIONS

L'activité sérologique de l'haptène de Wassermann n'est due à aucun des lipides actuellement connus : glycérides, phosphoaminolipides (restriction faite, peut-être, pour la β lécithine), cérébrosides, ni au cholestérol.

Cet haptène peut être obtenu dans certaines conditions sous une forme hydrosoluble.

L'activité sérologique de l'haptène de Wassermann peut être augmentée par addition de substances qui par elles-mêmes sont inactives.

Par simple mélange avec du sérum de porc, les préparations hapténiques acquièrent des propriétés antigéniques *in vivo*.

(12) Nous n'avons malheureusement, malgré nos efforts, pu nous procurer le texte original du travail de Sakakibara, paru au Japon, et l'extrait que nous en avons lu est très bref.

HAPTÈNES LIPOÏDIQUES SPÉCIFIQUES DES ORGANES

Les extraits alcooliques d'organes contiennent plusieurs haptènes ; les haptènes de Wassermann et de Forssman peuvent coexister dans une même préparation qui possède, en outre, une substance spécifique de l'organe d'où elle a été extraite. Cependant, ces diverses activités sérologiques sont indépendantes, un organe d'une espèce donnée pouvant posséder toutes ou certaines seulement de ces activités. Nous avons vu comment les divers organes et sécrétions d'une même espèce animale pouvaient contenir l'haptène de Forssman, tandis que ceux d'une espèce voisine en étaient totalement dépourvus. Inversement, dans le cas de l'haptène de Wassermann, on observe une inégale répartition de l'activité sérologique en fonction des organes : les cœurs et les foies fournissent des préparations très actives, tandis que les cerveaux donnent des extraits qui ne réagissent que peu ou pas avec les sérums syphilitiques. Lors des purifications, les diverses activités contenues dans l'extrait alcoolique brut peuvent être conservées ; c'est le cas, par exemple, des haptènes de Wassermann purifiés par Weil, Ritzenthaler et Merkens (195), dans lesquels la spécificité des organes : foie, cœur, rein, etc.... d'où ils ont été extraits persiste. Les résultats obtenus par ces auteurs dans l'étude de l'haptène syphilitique s'appliquent donc aux substances spécifiques des organes. Inversement, Rudy (153), Klopstock et Misawa (76) se sont attachés à dissocier, par des techniques d'adsorption et d'élution, les haptènes de Wassermann ou de Forssman d'avec les haptènes spécifiques des organes.

De nombreux auteurs ⁽¹³⁾ ont signalé dans les extraits alcooliques des organes les plus divers : cœur, foie, rein, rate, cerveau,

(13) Pour la bibliographie détaillée de cette partie, voir Landsteiner (80), page 63.

testicule, cristallin, etc..... l'existence de substances capables de fixer le complément en présence de sérum d'animaux préparés par injection de l'organe total. Mais l'étude chimique de tous ces extraits est bien peu avancée et nous avons vu, à propos de l'haptène de Forssman, qu'il n'est pas suffisant de constater la présence d'une substance dans un extrait lipodique pour affirmer qu'elle est de nature lipidique. On peut seulement conclure que des composés autres que des protéides peuvent être le support de la spécificité sérologique des organes.

Seul l'haptène du cerveau a fait l'objet d'études chimiques. Rudy (153) a fractionné systématiquement l'extrait alcoolique du cerveau. Dans ce but, il sépare les cérébrosides grâce à leur insolubilité dans l'éther, puis la créatine en lavant la solution étherée avec de l'eau salée ; il précipite alors la lécithine et la céphaline par du chlorure de cadmium, puis il extrait le cholestérol par de l'éther. L'haptène n'est lié à aucun de ces lipides connus. Après élimination du cadmium, la substance active est soluble dans l'éther et l'alcool et résiste à l'action des alcalis. Après saponification ménagée par de la baryte alcoolique, il obtient une préparation active qui est encore de nature lipidique ; elle est soluble dans l'éther et possède un indice d'iode élevé ($I = 111$). Elle n'est pas phosphorée, mais elle contient de l'azote et des oses. Son activité sérologique est élevée : 3 γ suffisent pour fixer l'alexine en présence de sérum anticerveau. Sachs et Schawb (159) ont décrit un deuxième haptène spécifique de l'organe dans la fraction dite « protagon » extraite du cerveau.

Le « polydiamino phosphatide », totalement exempt de glucide, extrait de la rate par Tropp (183) possède des propriétés hapténiques et il acquiert des propriétés antigéniques *in vivo* lorsqu'on l'associe à des protéides étrangers.

HAPTÈNE LIPOÏDIQUE DU BACILLE TUBERCULEUX

Structure antigénique du Bacille tuberculeux

Lorsqu'on veut appliquer à des sérums tuberculeux la réaction de Bordet et Gengou, on peut employer comme antigène soit une suspension de Bacilles de Koch, soit un extrait aqueux de ce microbe, ou du filtrat de culture sur bouillon, soit encore un extrait alcoolique de corps microbiens comme Much (32) puis Kurt Meyer (124) l'ont montré ⁽¹⁴⁾. Ce fait trahit la complexité de la structure antigénique de ce micro-organisme, complexité que l'on retrouve dans toutes les cellules microbiennes qui sont constituées suivant l'expression de M. Nicolle (138) par une « mosaïque d'antigènes ».

De nombreux auteurs ⁽¹⁵⁾ ont été amenés à la suite de travaux sérologiques à distinguer dans les Bacilles tuberculeux et dans leur milieu de culture, en plus de la Tuberculine, trois types d'antigènes : protéïdiques, lipoiïdiques et polyosidiques.

Tandis que la nature osidique du groupement spécifique de l'haptène de précipitation des Bacilles tuberculeux paraît bien établie (121) (70) (62) ⁽¹⁶⁾, la nature chimique de l'antigène de

(14) Pour l'étude et la bibliographie de la partie immunologique de cette question consulter Urbain (184) et Tadao Sugai (179).

(15) Thielle et Embleton (181), Dienes (42) (39) (40), Nègre et Boquet (134) (135) (136) (137), Sandor et Schaeffer (164), Sandor (162), Bonnefoi (17), K. Meyer (127) (128), revue générale par Macheboeuf et Dieryck (110).

(16) Notons cependant que Heidelberger et Menzel (69) (70) ont séparé de leur polyoside hapténique spécifique, sous l'action des alcalis, du palmitate de magnésium, fait intéressant à un triple point de vue :

1° L'élimination de ce palmitate ne modifie nullement les propriétés sérologiques du polyoside (argument supplémentaire en faveur de la nature osidique du groupement déterminant sa spécificité).

2° La présence de cet élément lipidique ne confère pas de propriétés antigéniques in vivo à ce polyoside dont la constitution chimique cependant le rapproche des complexes glucido-lipidiques : « antigènes complets » de Boivin et Mesrobian (16), et de Raitrick et Topley (150) extrait des bacilles « gram négatif ».

3° On peut interpréter par un même phénomène de solvation la présence fréquente de petites quantités d'osides parmi les phosphatides et celle de lipides parmi les polyosides : une molécule glucido-lipidique peut être solvatée par les lipides grâce à la présence d'acides gras ou par les polyosides grâce à la présence d'osides.

déviations contenu dans les préparations polyosidiques séparées des protéides est encore indéterminée (162), les divers auteurs qui l'ont étudié (Dienes (42) (39) (40), Sandor (164) (162), Bonnefoi (17), K. Meyer (127) (128), s'accordent pour le différencier nettement du point de vue sérologique de l'antigène lipodique. Mais, tandis que les uns (162) (127) (128) l'identifient avec l'antigène protéidique, les autres (42) (39) (40) (17) lui attribuent dans certains cas une spécificité propre.

Nous signalons également à côté de ces antigènes communs au groupe des Bacilles tuberculeux, l'existence d'un haptène de précipitation de nature lipidique incomplètement déterminée. isolé par Machebœuf et Dieryek (108) d'une souche bovine « lisse » et spécifique des variantes présentant ce caractère de culture.

Propriétés immunologiques de l'antigène lipodique du Bacille tuberculeux

Si d'une part l'antigène lipodique est nettement différencié du point de vue sérologique, des autres antigènes des Bacilles tuberculeux, d'autre part, sa spécificité s'étend à toutes les souches humaines, bovines, aviaires, pisciaires, paratuberculeuses et même à tout le groupe des Bacilles acido-résistants : Bacille de la Lèpre et de l'entérite hypertrophiante des Bovidés, de la Fléole (137) (184), etc. On a décrit également des antigènes lipodiques communs aux Bacilles tuberculeux, aux Bacilles diphtériques (137) (185) (41) (106), aux Streptothricées (54) (22) (63) et à l'ovolécithine (136). Nègre et Boquet (137) ont même démontré, pour un certain nombre de ces bacilles (B. diphtérique, de la Fléole, de l'entérite hypertrophiante) et pour l'ovolécithine, qu'il y a complète réciprocité d'action entre ces divers antigènes lipodiques : ces extraits méthyliques d'origines différentes dévient le complément en présence de sérum anti-tuberculeux, et les anticorps qu'ils engendrent par injection au Lapin fixent l'alexine en présence de l'extrait qui leur a donné naissance et de l'extrait méthylique du Bacille tuberculeux. L'antigène lipodique du Bacille de Koch peut également servir d'haptène dans la réaction de Wassermann, ce qui restreint l'utilisation du sérodiagnostic de la tuberculose ; mais ici, la réaction inverse ne se produit pas, les sérums purement tuberculeux ne dévient pas le complément en présence d'haptène syphilitique.

Les deux anticorps tuberculeux et syphilitique sont différents et on peut les dissocier par des procédés sérologiques d'adsorption sélective (23). Malgré l'existence de ces quelques réactions hétérogènes, l'antigène lipoidique au Bacille tuberculeux présente cependant une spécificité bien déterminée et intéressante du point de vue du sérodiagnostic de la Tuberculose. En effet les sérums expérimentaux ou thérapeutiques antimicrobiens ou antitoxiques (exception faite du sérum antidiptérique), ainsi que les sérums des malades atteints d'affections autres que la tuberculose et la syphilis (sauf peut-être de paludisme) ne dévient pas le complément en présence d'antigène lipoidique (137) (184). (Plusieurs auteurs (181) (4) ont également employé cet antigène lipoidique comme antigène et haptène de précipitation).

L'haptène lipoidique du Bacille tuberculeux, son rapport avec l'antigène lipoidique

Certains extraits alcooliques bruts des Bacilles tuberculeux sont antigéniques *in vivo*, mais, dès que l'on tend à isoler les constituants purement lipidiques, contenus dans ces extraits, on voit disparaître les propriétés antigéniques *in vivo* que possédait l'extrait brut ; on obtient une préparation qui ne renferme plus que l'haptène lipoidique (Dienes) (391).

Cet haptène lipoidique existe donc sous une autre forme dans le Bacille intact qui est capable de donner naissance à des anticorps lipidiques ; dans les quelques extraits alcooliques bruts qui également engendrent des anticorps, mais en quantité bien moindre que les bacilles entiers, l'haptène doit se trouver en partie sous une forme antigénique *in vivo*.

Pour expliquer ces faits, Dienes (39), Nègre et Boquet (136) (137), K. Meyer (127) émettent l'hypothèse de l'existence d'un complexe, probablement de nature lipoprotéidique, plus ou moins décomposé par l'action de l'alcool ou d'un chauffage à 120° : le lipide représenterait l'élément spécifique actif *in vitro* et le protéide constituerait le support conférant à l'haptène des propriétés antigéniques *in vivo*. C'est également par l'existence d'un complexe « antigène lipoidique + protéide » que Ninni (139) et Sandor (163) (164) expliquent comment les protéides extraits du milieu de culture contiennent l'haptène lipoidique sous une forme hydrosoluble, mais dépourvue d'activité fixatrice ; cette

propriété fixatrice n'apparaît qu'après traitement par de l'alcool, dans une substance lipoïdique devenue alors insoluble dans l'eau (Machebœuf, Sandor et Ninni) (117).

L'antigène lipoïdique paraît donc constitué par un cénapse. En effet, si l'on a soin de ne pas dénaturer ce cénapse par la chaleur, par des réactifs acides ou alcalins et même par de l'alcool en appliquant la technique de délipidation fractionnée de Machebœuf, Diéryck et Stoop (111), on peut extraire les Bacilles tuberculeux vivants par de l'acétone froide, puis par de l'éther sans leur enlever d'haptène lipoïdique. Cependant, cet haptène, après avoir été extrait par de l'alcool est parfaitement soluble dans l'éther. Dans le Bacille vivant, il est donc masqué à l'action de l'éther, il est inclus dans un cénapse qui est décomposé par l'alcool. Les corps bacillaires traités par l'acétone et l'éther froids renferment encore la totalité de l'antigène lipoïdique, car par injection à l'animal, ils engendrent en abondance des anticorps susceptibles de fixer l'alexine en présence d'haptène lipoïdique. Ces corps bacillaires partiellement délipidés à froid, possèdent de plus un fort pouvoir vaccinant : « chimio-vaccin » de Machebœuf et Dieryck (190). Le cénapse qui constitue l'antigène lipoïdique est assez stable ; il résiste à l'action de l'acétone froide et il n'est décomposé que lentement par l'alcool froid : pour extraire la totalité de l'haptène, il est nécessaire de traiter par de l'alcool bouillant les corps bacillaires ou les protéides qui en ont été extraits (164) (107).

*
**

Par simple mélange avec du sérum de porc, l'haptène lipoïdique est susceptible de recouvrer son pouvoir antigénique in vivo (Machebœuf et Ninni) (116).

On retrouve également ici, comme dans l'étude des haptènes de Forssman et de Wassermann le même phénomène d'augmentation de l'activité sérologique spécifique des préparations hapténiques par addition d'une substance aspécifique par elle-même inactive : la lécithine commerciale (Dienes) (43) (39). Mais ces expériences portant sur des émulsions colloïdales, il n'est pas possible de conclure si la substance aspécifique agit par elle-même, ou si elle intervient seulement en modifiant l'état de dispersion de l'haptène.

Nature chimique de l'haptène lipodique du *Bacille tuberculeux*

En 1910, K. Meyer (123) ayant observé que l'activité hapténique est détruite par la lipase et qu'elle ne l'est pas sous l'action de la pepsine et de la trypsine, cet auteur conclut que cet haptène est de nature lipodique. En effet, Much (123), l'année suivante, retrouve cette activité parmi les graisses neutres extraites du *Bacille tuberculeux*. Bientôt, K. Meyer (124) constate que l'haptène se concentre dans les lipides acétono-insolubles, c'est-à-dire avec les phosphatides de ce bacille ; il note également que la fraction insoluble dans l'alcool, qu'il suppose être de la céphaline, est plus active que les phosphatides solubles dans ce solvant. Ces résultats sont confirmés par Thiele et Embleton (181) et par Petroff (144) dont les fractionnements n'apportent pas de nouvelles indications. Afin d'obtenir un extrait alcoolique plus actif, Nègre et Boquet (133) (135) (136) (134) (137) éliminent des lipides inertes par un traitement acétonique préalable des *Bacilles*, puis, ils extraient les principes actifs par de l'alcool méthylique. Leurs travaux ont pour objet principal l'étude des propriétés thérapeutiques et antigéniques *in vivo*, ainsi que la spécificité des réactions sérologiques *in vitro* de leur « antigène méthylique ».

Dienes et ses collaborateurs (40) (42) constatent que les extraits méthyliques des *Bacilles tuberculeux* sont constitués par des mélanges complexes d'où il est difficile de séparer la substance active. En traitant leur préparation insoluble dans l'acétone par de l'acide chlorhydrique dilué, ils ont obtenu une fois une fraction soluble dans l'acétone et douée d'une activité hapténique très élevée ; cette fraction contenant 7,2 p. 100 de phosphore, 0,5 p. 100 d'azote, 15 p. 100 d'acides gras et 17 p. 100 de glucides. Mais ces auteurs n'ont jamais pu reproduire cette préparation. De leurs nombreux essais qui ont souvent donné les résultats inconstants, ils peuvent cependant conclure que la substance hapténique possède une grande affinité pour l'eau, même en présence d'éther, et qu'elle paraît être une substance lipodique phosphorée et probablement non azotée ; ils constatent également que son activité sérologique n'est nullement fonction de sa teneur en oses.

Machebœuf et ses élèves ont repris l'étude systématique de l'activité hapténique des divers lipides du *Bacille tuberculeux*.

Dans des essais préliminaires effectués avec des bacilles tués par la chaleur et extraits par des solvants organiques bouillants, Machebœuf, Levy et Chambaz (116) (113) ont constaté que cette activité n'existait que dans une seule fraction bien déterminée de lipides extraits par l'alcool ; ces lipides très riches en phosphore, sont solubles dans l'éther et le chloroforme et insolubles dans l'acétone. Si l'on se contente de répéter les précipitations de cette fraction par de l'acétone, on ne modifie ni sa composition, ni son activité sérologique. Cependant la fraction est encore un mélange, car des précipitations successives de sa solution chloroformique par l'alcool méthylique à 0° permettent de séparer des fractions de pouvoir hapténique et de constitution nettement différentes : la fraction la moins soluble est trois fois plus active et deux fois moins riche en azote que la fraction la plus soluble (Machebœuf et Bonnefoi) (105). Les solubilités dans le mélange de chloroforme et d'alcool méthylique des lipides contenus dans la fraction la plus active sont alors trop voisines pour que l'on puisse pousser la purification de l'haptène plus avant par cette méthode.

Lorsque l'on soumet des bacilles vivants à une extraction fractionnée par des solvants organiques à froid et sous le vide, on sépare par l'acétone, puis par l'éther, une grosse quantité de lipides ne possédant aucun pouvoir haptène. Si l'on traite ensuite les corps bacillaires par de l'alcool méthylique froid, on extrait des substances lipoidiques qui possèdent une très forte activité hapténique (Machebœuf, Dieryck et Stoop) (111). C'est certainement par cette méthode que l'on peut obtenir directement l'haptène lipoidique dans des conditions optimales de pureté et de moindre dénaturation, mais elle est dangereuse (manipulation de grandes masses de bacilles vivants), coûteuse et longue.

Comparés aux travaux effectués sur l'haptène de Forssman, ces études étaient alors à peine ébauchées et ne permettaient pas de tirer de conclusions bien précises sur la nature chimique de l'haptène lipoidique du Bacille tuberculeux. Monsieur le Professeur Machebœuf nous a associée, dès 1933 ⁽¹⁷⁾, à ses recherches sur ce sujet et c'est ce travail qui fait l'objet de la présente thèse.

(17) Notons également qu'à cette date, la plupart des travaux chimiques effectués sur les divers haptènes lipoidiques que nous avons résumés ici, n'étaient pas encore publiés.

CONCLUSIONS

L'haptène contenu dans les extraits alcooliques de Bacilles tuberculeux paraît être de nature lipidique, car il est soluble dans les solvants organiques et il est détruit par la lipase.

Dans le Bacille vivant il est à l'état de cénapse probablement lipoprotéidique que l'alcool décompose.

Comme les autres haptènes du même type, il accompagne les phosphatides dans les extraits alcooliques. Ces phosphatides sont constitués par un mélange de substances lipoïdiques d'où l'on a pu séparer des fractions phosphorées plus actives et moins riches en azote que la préparation brute initiale.

L'activité fixatrice in vitro de cet haptène peut être augmentée par addition d'une substance par elle-même inactive : la lécithine commerciale.

Par simple mélange avec du sérum de porc, les préparations purement hapténiques acquièrent des propriétés antigéniques in vivo.

ETUDE SÉROLOGIQUE DES ACIDES ALIPHATIQUES DE LA LÉCITHINE ET DES STEROLS

Du point de vue haptène de fixation de l'alexine

Des molécules purement lipidiques ou lipoïdiques ne contenant pas d'oses sont-elles capables de jouer le rôle d'haptène dans la réaction de fixation de l'alexine ? Les études analytiques qui ont été effectuées sur les divers haptènes lipoïdiques (haptènes de Forssman, de Wassermann, spécifiques des organes, du Bacille tuberculeux) ne permettent pas de donner de réponse certaine à cette question. S'il est démontré dans le cas de l'haptène de Forssman, que seule la fraction osidique de sa molécule est responsable de sa spécificité sérologique, on ne peut affirmer qu'il en est de même avec les autres haptènes lipoïdiques. Divers auteurs ont tenté de résoudre directement ce problème en étudiant le pouvoir hapténique des acides aliphatiques, des phosphatides, des stérols et de leurs dérivés.

Etude immunologique des acides aliphatiques

Landsteiner (96) (88) réalise ses premiers antigènes synthétiques en faisant agir des anhydrides ou chlorures d'acides variés (acides butyrique, isobutyrique, mono, di et tri chloracétiques, etc.....) sur des protéides. A l'aide de la réaction de déviation du complément, il montre que la spécificité originelle des protéides est modifiée et que ces diverses substances se différencient nettement du point de vue sérologique ; mais elles présentent des réactions croisées lorsque les radicaux introduits ont une parenté chimique. Plus tard, Landsteiner et Van der Scheer (99) fixent par diazotation sur des protéides des chaînes aliphatiques diacides copulées avec de la p. nitroaniline. Par cette méthode ils différencient sérologiquement les acides oxa-

lique, malonique, succinique, glutarique, adipique, pimélique et subérique ; des réactions croisées (mais également des réactions aspécifiques) apparaissant parmi les composés de poids moléculaires les plus élevés.

Etude immunologique des phosphatides

Les premiers, Sachs et Klopstock (156), obtiennent par injection de lécithine et de cholestérol, simplement mélangés avec du sérum de porc, des anticorps spécifiques qui devient le complément avec la lécithine d'une part, et le cholestérol d'autre part, ces composés jouant le rôle d'haptène dans cette réaction. Ces résultats, intéressants par le fait que la lécithine et le cholestérol sont des constituants normaux de tous les tissus animaux sont confirmés par de nombreux auteurs. (Ornstein (142) avec de la lécithine et des cérébrosides, Dessy (37) avec des lécithines de soja et d'œuf, Bisceglie (12) avec du cholestérol, Breier (21) avec de la lécithine d'œuf et Plaut et Kassowitz (145) avec des phosphatides et des cérébrosides et du cholestérol). Mais tous ces travaux ont été effectués avec des produits impurs et ne permettent pas de tirer de conclusion certaine.

En employant une préparation commerciale de lécithine d'œuf, Landsteiner, Levene et Van der Scheer (94) reproduisent aisément ces expériences. Mais, ayant préparé et purifié eux-mêmes de la lécithine, leur substance s'est montrée dépourvue d'activité hapténique vis-à-vis des sérums « antilécithine commerciale » ; elle est également dépourvue de pouvoir antigénique après mélange avec du sérum de porc. Plaut et Rudy (146) n'obtiennent également que des résultats négatifs avec de la lécithine de cerveau. On pouvait donc penser que seules les impuretés des préparations commerciales étaient douées de propriétés hapténiques.

Cependant Weil et Besser (191 et Maier (119) obtiennent des anticorps par injection de la lécithine distéarique synthétique de Grün mélangée avec un sérum étranger. Mais tandis que Maier observe des réactions croisées entre les sérums « antilécithine synthétique » et la lécithine commerciale et vice-versa, Weil et Besser sont amenés à conclure, après avoir fait les mêmes réactions, à une spécificité définie.

Wadworth et Maltaner (186) reprennent l'étude des lécithines et céphalines commerciales et purifiées ; ayant obtenu des

anticorps seulement avec les préparations commerciales, ils concluent à nouveau, comme Landsteiner, que leur propriété antigénique est liée à la présence d'impuretés et non aux molécules de lécithine et de céphaline elles-mêmes.

Etant donnés ces résultats contradictoires, il serait intéressant de poursuivre ces recherches avec des préparations chimiquement bien définies. Mais on peut déjà expliquer certains de ces faits en remarquant que les lécithines naturelles ne sont pas identiques à la lécithine synthétique : cette dernière ne possède que des acides gras saturés, tandis que les premières sont formées par un mélange d'acides gras saturés et non saturés. La lécithine synthétique est donc différente de la lécithine naturelle, et, comme elle, n'existe pas dans l'organisme animal, on comprend qu'elle puisse engendrer des anticorps après union avec un protéide.

Etude immunologique des stérols et de leurs dérivés

L'étude des stérols, au contraire, a conduit les divers auteurs à des résultats concordants et semble montrer une grande spécificité des différents stérols. Bisceglie (12), puis Plaut et Kassowitz (145) obtiennent comme Sachs et Klopstock (141) des sérums anticholestérol d'une spécificité bien définie qui permet même à Bisceglie de différencier le cholestérol irradié du cholestérol initial. Weil et Besser (191) (192) font une étude sérologique systématique de toute une série de dérivés des stérols. Toujours par la même méthode de mélange de la suspension aqueuse de la substance étudiée avec du sérum de pore, ils obtiennent des anticorps spécifiques vis-à-vis du cholestérol, du dihydrocholestérol, de l'hydroxycholestérol et de l'ergostérol, tandis que dans les mêmes conditions l'oxyde, le dibromure, l'acétate et le palmitate de cholestérol n'en engendrent pas. Berger et Scholer (11) ont étudié les réactions des sérums anticholestérol et anti-ergostérol avec une série de stérols et divers de leurs dérivés ; ces auteurs concluent à une très haute spécificité de leurs sérums qui leur permettent de distinguer l'ergostérol du cholestérol et l'ergostérol irradié de l'ergostérol intact.

Malgré l'utilisation de molécules chimiquement bien connues, les résultats obtenus ne permettent pas encore de tirer des conclusions définitives. Les causes d'erreur proviennent dans ce cas, non de la connaissance imprécise de l'antigène, comme avec

les haptènes lipoidiques naturels, mais de celle des anticorps. D'une part, bien des auteurs affirment avoir obtenu des anti-sérums, mais ces sérums sont si pauvres en sensibilisatrices, qu'ils doivent les employer non dilués ou à peine dilués pour fixer l'alexine qui d'ailleurs ne se fixe que d'une manière incomplète. D'autre part, il ne faut pas oublier que certains immun-sérums, obtenus avec divers azoprotéides (170) n'ayant rien de commun avec la lécithine ou le cholestérol et même des sérums d'animaux neufs n'ayant reçu aucune injection, dévient le complément en présence de ces substances qui réagissent également d'une manière non spécifique avec des sérums produits par injection d'extraits d'organes (46).

Enfin Wadworth et Maltaner (187), ayant remarqué des différences dans le mode d'action des immun-sérums ordinaires et des sérums anticholestérol, ont été amenés à douter de la spécificité de ces derniers.

Cependant nous tirerons les conclusions suivantes qui ne sont peut-être que provisoires.

CONCLUSIONS

Des chaînes aliphatiques peuvent déterminer une spécificité sérologique.

Seule la lécithine distéarique synthétique mélangée avec du sérum de porc, peut engendrer des anticorps, tandis que les lécithines naturelles convenablement purifiées sont incapables d'en produire dans les mêmes conditions.

Certains stérols, associés à des protéides étrangers donneraient naissance à des sensibilisatrices spécifiques du stérol injecté, mais ce fait est encore très imparfaitement démontré.

LES HAPTÈNES LIPOÏDIQUES

Conclusions et caractères généraux

La solubilité n'est pas un caractère suffisant pour déterminer la nature chimique d'une substance, principalement de ces haptènes si actifs dilués dans une masse considérable de matières inertes. Nombreux sont les exemples de variation de la solubilité au cours d'une purification. D'un extrait aqueux, par exemple, on retire finalement une substance soluble dans l'alcool ou l'éther et contenant des lipides, d'un extrait alcoolique, on sépare après purification, un composé parfaitement soluble dans l'eau, insoluble dans les solvants organiques et riche en osides. Ces faits peuvent s'expliquer par des phénomènes de solvations réciproques qui sont particulièrement marqués avec les lipides, mais ils exigent cependant une communauté au moins partielle de structure : un simple mélange de glycérides et de polyosides est facile à séparer, tandis qu'un glucido-lipide pourra être entraîné d'une part, par les lipides grâce à ses acides gras, d'autre part par les polyosides grâce à ses molécules d'oses. C'est pourquoi la composition chimique des haptènes lipoïdiques est encore si mal connue. Seule la nature osidique du groupement spécifique de l'haptène de Forssman est établie ; mais l'on ne sait pas encore si toutes ces substances possèdent une structure analogue ou s'il existe des haptènes naturels purement lipidiques. Cette deuxième hypothèse est plausible, puisque la lécitine distéarique synthétique et même des acides gras inclus dans des antigènes artificiels sont susceptibles de déterminer des spécificités sérologiques propres, mais l'on n'a pas encore isolé dans la nature de préparation hapténique rigoureusement lipidique.

Quoiqu'il en soit, les haptènes que l'on qualifie de « lipoïdiques » possèdent des propriétés communes.

1. — Leur spécificité sérologique n'est pas étroitement restreinte comme celle de certains polyosides bactériens caractéri-

sant des souches bien précises, mais, au contraire, elle enveloppe de larges groupes ; les réactions hétérogènes sont fréquentes, mais cependant bien déterminées.

2. — Dans certaines conditions, ces haptènes sont susceptibles d'être activés d'une manière considérable par addition de substances lipoidiques inertes par elles-mêmes. Certains auteurs pensent même que les haptènes lipoidiques seraient constitués par un élément spécifique peu ou pas actif lui-même et par un élément aspécifique qui permettrait à l'élément spécifique de manifester son activité ou l'exalterait considérablement. Mais cette conception n'est pas encore démontrée, car dans tous les cas où l'on a observé ce phénomène d'activation, on a opéré avec des substances non solubles dans l'eau qui étaient à l'état d'émulsion ; il est possible que le rôle de l'élément aspécifique soit purement physique et qu'il n'intervienne que pour favoriser la dispersion de l'élément spécifique dans l'eau.

3. — Enfin, il est un caractère commun à tous ces haptènes lipoidiques naturels ou artificiels et bien caractéristique : par simple mélange avec un protéide, ils acquièrent tous un pouvoir antigénique *in vivo*. Cette propriété paraît bien liée à leur caractère lipoidique indépendamment de la nature du groupement déterminant la spécificité. Dans le cas de l'haptène de Forssman, par exemple, seules les préparations lipoidiques jouissent de cette propriété, les polyosides bactériens, excellents haptènes *in vitro*, sont incapables d'engendrer des anticorps par cette méthode. Il faut, pour qu'ils deviennent antigènes les combiner chimiquement à des protéides ; il ne suffit pas de les mélanger simplement avec des protéides.

Si d'une part les polyosides paraissent occuper une place prépondérante dans la détermination de la spécificité des antigènes naturels, les lipides semblent jouer un rôle aspécifique, mais cependant important, dans les réactions *in vitro* et surtout avoir un rôle de facteur intermédiaire indispensable dans la formation de certains complexes antigéniques par simple mélange avec des protéides.

“ ANTIGÈNES COMPLETS ” GLUCIDO-LIPIDIQUES

Nous ne voulons pas passer sous silence l'existence de ces « antigènes complets » découverts parallèlement par Boivin et Mesrobeanu (16) d'une part et par Raitrick et Topley (150) (177) (182) d'autre part, dans les bactéries à « gram négatif ». Ces préparations que l'on peut obtenir très simplement en traitant les bactéries par l'acide trichloracétique (technique de Boivin) semblent dépourvues de protéides et cependant, elles possèdent des propriétés antigéniques *in vivo* intenses. Elles seraient constituées par un « complexe glucido-lipidique » que l'on peut dissocier partiellement sous l'action de l'acide acétique. Lors de ce traitement, les propriétés antigéniques *in vivo* sont détruites, tandis que la fraction lipidique inactive se sépare d'une fraction osidique qui possède encore des propriétés hapténiques. Cet haptène étant de nature osidique, il n'entre pas dans le cadre que nous nous sommes fixées. Cependant, si ce fait est un argument de plus en faveur de la nature osidique des groupements spécifiques des haptènes naturels, il semble confirmer le rôle aspécifique, mais cependant indispensable du facteur lipidique dans la constitution de certains antigènes naturels.

CHAPITRE II

ÉTUDE CHIMIQUE DES PHOSPHATIDES DU BACILLE TUBERCULEUX

Nous venons de voir que, suivant la règle générale, l'haptène lipoïdique du Bacille tuberculeux accompagne les phosphatides. Avant d'exposer nos propres recherches sur ce sujet, nous allons examiner les renseignements que les travaux purement chimiques peuvent nous fournir sur la composition de cette fraction. Comme il est difficile, à cause des phénomènes de solvation, de séparer complètement les lipides les uns des autres, afin de connaître la nature des impuretés qui peuvent souiller les phosphatides, nous donnerons en outre un très bref aperçu de la composition lipidique du Bacille tuberculeux.

LES LIPIDES DU BACILLE TUBERCULEUX

Le Bacille de Koch, comme tous les bacilles du groupe des bacilles acido-résistants, est caractérisé par une grande richesse en lipides. Cette teneur varie beaucoup selon les souches, le milieu et l'âge de la culture, elle peut atteindre 27 p. 100 de poids de bacilles secs (111) et n'est jamais inférieure à 12 p. 100 (29) (les bacilles non acido-résistants n'en contiennent que 5 à 8 p. 100 de lipides (33) (106)).

Ces lipides ont fait l'objet de très nombreux travaux (1), car

(1) Nous ne donnerons pas dans ce bref résumé les références des innombrables travaux tant chimiques que biologiques qui ont été faits sur ce sujet, mais seulement l'indication des principales revues où l'on pourra trouver toute cette bibliographie : Anderson (5), Wells et Long (196), Machebœuf et Diéryck (110), Fethké (48).

c'est eux qui confèrent au Bacille tuberculeux un grand nombre de ses propriétés physicochimiques et biologiques si spéciales : résistance aux agents bactéricides physiques et chimiques, « acido-résistance » tinctoriale, haptène de fixation de l'alexine, résistance à la phagocytose, formation du tissu tuberculeux avec ses cellules géantes et de type Langhans et peut-être même la caséification des lésions tuberculeuses, etc.... Ce bacille renferme, en effet, un mélange non seulement abondant, mais encore fort complexe de substances lipoidiques très particulières que l'on peut séparer en trois grands groupes : graisses acétono-solubles, fraction phosphatidique et substances dites « cireuses ».

Contrairement à ce que l'on observe chez les plantes et les animaux, les lipides acétono-solubles sont peu riches en glycérides ; ils renferment, en outre, des acides gras libres (112), des esters d'un insaponifiable soluble dans les solvants organiques et qui n'est pas un stérol, et des esters d'un alcool soluble dans l'eau autre que le glycérol et qui n'est pas un glucide.

A partir de la fraction phosphatidique brute extraite par l'alcool, on peut séparer, d'une part, une fraction phosphorée insoluble dans l'éther, libérant par hydrolyse des acides gras, un insaponifiable et du glycérol, d'autre part, des phospholipides solubles dans l'éther et insolubles dans l'acétone. Nous étudierons plus en détail cette deuxième fraction, car c'est dans cette fraction que se concentre l'activité hapténique de déviation.

Les substances « cireuses » très abondantes se rapprochent des cires plus par leurs propriétés physiques que par leur constitution chimique. Elles sont toutes solubles dans l'éther, le chloroforme, le benzène et l'éther de pétrole, mais grâce à leurs différentes solubilités dans l'acétone et l'alcool froids ou bouillants, on peut séparer des fractions plus ou moins bien définies. Elles sont peu ou pas phosphorées et libèrent toutes par saponification (qui d'ailleurs est difficile) des acides gras et des insaponifiables, mais en proportions très différentes suivant les fractions. Tandis que la « cire » dite « acido-résistante » est uniquement composée par ces deux constituants, d'autres fractions cireuses renferment en quantité considérable des osides constitués de pentoses (40 p. 100) et des alcools hydrosolubles non réducteurs et autres que le glycérol.

LES PHOSPHATIDES DU BACILLE TUBERCULEUX

Les premiers auteurs qui ont étudié les lipides du Bacille tuberculeux ont presque tous signalé la présence de phosphatides qu'ils désignent alors sous le nom de lécithine, par analogie avec les lipides phosphorés insolubles dans l'acétone extraits des animaux et des plantes (Hammerschlag (64), Auclair et Paris (7), Kresling (77), Baudran (10)). Sakae Tamura (160) isole de l'extrait étheré un phosphatide qui n'est pas de la lécithine, mais, que ses teneurs en phosphore et en azote lui font prendre pour un diaminophosphatide. Agulhon et Frouin (1) montrent que ce composé phosphoré est un mélange complexe du genre des « jécoringes » qui, par saponification, libère des acides gras, du glycérol, une base analogue à la choline, et une gomme donnant du glucose par hydrolyse acide.

Ces premiers travaux ont été effectués avec des bacilles tués par la chaleur et extraits par des solvants bouillants sans précaution contre l'oxydation. Pour éviter la dénaturation des produits par la chaleur et leur oxydation au contact de l'air, Anderson (3) traite les bacilles vivants par un mélange d'alcool et d'éther à la température ordinaire et dans une atmosphère de gaz carbonique. De l'extrait alcool-étheré, il sépare les phosphatides qu'il se contente de purifier par des précipitations répétées de leur solution étherée par de l'acétone. Il appelle « phosphatide purifié » A₃ la fraction qu'il obtient ainsi. Cette fraction contient 2,7 p. 100 de phosphore et 0,4 p. 100 d'azote ; par hydrolyse acide elle donne : 1° 67 p. 100 de substances étherosolubles contenant un peu de « cire insaponifiable » et un mélange d'acides palmitique, oléique et de deux acides saturés liquides à chaînes ramifiées, bien particuliers : l'acide tuberculostéarique en C₁₉ et l'acide phtioïque en C₂₆⁽²⁾ ; 2° 33 p. 100 de substances hydrosolubles parmi lesquelles Anderson a identifié de l'acide glycérphosphorique, du glucose, du mannose, un cétose, de l'inositol et une base azotée, qui n'est pas de la choline, mais principalement de l'ammoniaque (44). Les oses sont à l'état d'osides (gomme décrite par Agulhon et Frouin), car la saponification par la potasse alcoolique bouillante ne libère pas de fonction

(2) C'est à cet acide phtioïque, présent également dans d'autres fractions lipidiques du Bacille de Koch, que l'on attribue la réaction cellulaire spécifique des lésions tuberculeuses.

réductrice ; l'auteur obtient ainsi une solution de savons avec de petites quantités d'acide phosphorique et de glycérol libre, et un résidu insoluble dans l'alcool. A partir de ce résidu, il isole par précipitation par l'acétate neutre de plomb, un acide phosphorique complexe dont le sel de baryum répond à la formule $C_9H_{20}O_{14}P_2Ba_2$ et qui ne réduit la liqueur de Felhing qu'après hydrolyse acide. La solution mère du précipité plombique contient encore du phosphore : 2,33 p. 100 sous une forme indéterminée ; Anderson ayant isolé de cette fraction après hydrolyse acide du mannose et de l'inositol, il en déduit, sans plus de preuve, l'existence d'un nouveau type d'oside : le « mannositose ». Cette affirmation est plausible, mais elle est incomplètement démontrée ; il n'est pas suffisant de constater l'apparition de fonctions réductrices après hydrolyse acide d'un produit pour conclure que les diverses molécules qui le composaient étaient unies pour former une seule substance : dans le cas présent, par exemple, un mélange d'inositol et de mannosane non réductrice donnerait les mêmes résultats analytiques.

Tout récemment, alors que nos recherches expérimentales étaient pratiquement terminées, Anderson (6) a publié un nouveau travail sur les produits d'hydrolyse par la potasse alcoolique froide de son « phosphatide purifié » A_3 extrait de Bacilles humains. Les acides gras ayant été éliminés, l'acétate neutre de plomb ne précipite qu'une petite quantité d'acide organophosphorique contenant 26 p. 100 d'oses réducteurs (après hydrolyse acide). Presque toute la substance est sous la forme d'un polyoside contenant 6,2 p. 100 de phosphore non précipitable par le plomb ; ce polyoside traité par la potasse alcoolique bouillante fournit un acide phosphoorganique insoluble dans l'alcool (donc ce n'est pas de l'acide glycérophosphorique libre) précipitable par l'acétate neutre de plomb et libérant par hydrolyse acide du mannose et probablement de l'acide glycérophosphorique (mais cet acide n'a pas été identifié directement). Après cette saponification une partie du phosphore est encore sous une forme non précipitable par le plomb. Ce polyoside phosphoré est chauffé à 170° avec de l'ammoniaque diluée, tout le phosphore se sépare, à l'état d'acide phosphorique minéral d'avec un oside non réducteur contenant 18 atomes de carbone : le « mannositose », car par hydrolyse acide, il donne environ deux molécules de mannose pour une d'inositol (3). A partir de ces résultats.

(3) Notons que l'auteur n'a pas recherché le glycérol dans les produits de cette dernière saponification.

l'auteur conclut que « le » phosphatide du Bacille tuberculeux humain contient deux « hydrates de carbone » : un acide diphosphorique du mannose-glycérol et un acide phosphorique du manninose.

Même dans ce dernier travail, Anderson semble considérer son « phosphatide purifié » comme une substance définie et pure, or nous avons vu que les recherches, tant chimiques que biologiques, tendent à montrer que ces préparations sont constituées par des mélanges complexes de substances. Au lieu de chercher à dissocier les produits d'hydrolyse de sa préparation A₃, il édifie à l'aide de tous ces éléments caractérisés une molécule unique ⁽⁴⁾.

Ainsi Bloch (13) montre que la substance cireuse du « phosphatide purifié » d'Anderson peut être facilement extraite par de l'acétone à 30° ; donc elle n'est pas chimiquement liée au reste de la fraction. Il prétend même que les oses sont à l'état d'osides libres non associés à des acides gras. En traitant ce phosphatide, mis en suspension dans de l'eau, par un courant de gaz carbonique, puis en l'extrayant par de l'éther, il obtient dans la phase étherée un phospholipide totalement privé d'azote ⁽⁵⁾ et ne contenant plus que 1 à 2 p. 100 d'oses, tandis que des osides et l'azote, sous forme d'ion ammonium, restent dans la phase aqueuse. Ce phosphatide traité par de l'acide chlorhydrique dilué et froid, libère du magnésium et un acide organique phosphoré soluble dans l'acétone que l'on purifie à l'état de sel de plomb. Bloch n'a pas étudié les produits d'hydrolyse de cet acide ; mais, par analogie avec les acides glycérophosphatidiques découverts par Chibnall et Channon (31) (172) (30) et en se basant sur la teneur en phosphore (3,8 p. 100) et le résultat de la titration de l'acide libre (il suppose que c'est un diacide), il conclut que le phosphatide, soit disant complexe, du Bacille tuberculeux humain est un sel de magnésium d'un acide diglycérider phosphorique contenant comme impuretés sans liaison chimique de l'ammoniaque, un polyoside et une substance cireuse.

(4) Ce mode de raisonnement se rencontre, hélas, trop souvent en chimie biologique où des auteurs ont tendance à assimiler trop rapidement des fractions définies par leur seule technique d'obtention à des entités chimiques. Découvrant dans les produits de dégradation de leur « substance pure » des molécules très différentes, ils échafaudent des complexes qui fréquemment se résolvent en grossiers mélanges. Les immunochimistes spécialement qualifient leurs préparations de « polyosides purs » ou de « lipides purs » uniquement parce qu'elles ne donnent plus les réactions des protéides, mais cette désignation n'a qu'un sens restreint qu'il ne faut pas confondre avec la pureté chimique.

(5) Notons que nous avions publié un an auparavant l'obtention d'une abondante fraction phosphatidique ne renfermant pratiquement plus d'azote, et seulement 3,3 p. 100 d'oses (115).

Notons d'une part que le « phosphatide purifié » préparé par Bloch à partir de bacilles déshydratés et extraits plusieurs fois par de l'acétone n'est pas identique au phosphatide A₃ obtenu par Anderson à partir de bacilles humides extraits directement par l'alcool-éther ; Bloch ne donne pas le pourcentage d'oses contenus dans son « phosphatide purifié », mais étant donné la petite quantité de polyosides extraits de la phase eau, après traitement par le gaz carbonique et l'éther, on peut calculer qu'elle est au maximum de 4 p. 100, tandis que le phosphatide d'Anderson en renferme 14 p.100 ; d'autre part, l'existence uniquement d'acide glycérophosphatidique n'explique pas la présence dans les produits de saponification du phosphatide d'Anderson d'un acide organique phosphoré non précipitable par l'acétate neutre de plomb. Il est probable que le phosphatide d'Anderson contient, à côté d'oses inclus dans une molécule lipidique, des polyosides libres qui expliqueraient la propriété antigénique de précipitation signalée par cet auteur dans ses préparations (propriétés que nous n'avons jamais retrouvées dans nos propres fractions même les plus riches en oses, lorsque la purification est un peu plus avancée).

Aucun des auteurs précédemment cités n'a pu caractériser la présence de choline dans les phospholipides du bacille de Koch ; cependant Dessy et Francioli (38) affirment que des « phosphatides dans le sens commun du terme » (?) seraient présents mais en petite quantité. Dans les produits d'hydrolyse chlorhydrique des phosphatides du Bacille tuberculeux. Hecht (65) identifie la choline par ses propriétés biologiques après décomposition de son chloroplatinate ; cet auteur conclut que le Bacille tuberculeux contient de la lécithine.

CONCLUSIONS

Les résultats obtenus par les divers auteurs paraissent contradictoires :

d'après Bloch les phosphatides du Bacille de Koch seraient uniquement constitués par un sel de magnésium d'un acide phosphatidique dépourvu d'azote et d'oses ;

d'après Anderson, au contraire, ils formeraient une molécule complexe résultant de l'union d'un acide diphosphorique du mannose-glycérol et d'un acide phosphorique du manninositose avec des acides gras dont certains très particuliers et d'une substance cireuse.

La présence de lécithine est discutée.

DEUXIÈME PARTIE

**ÉTUDE EXPÉRIMENTALE
DE L'HAPTÈNE LIPOÏDIQUE DU
BACILLE TUBERCULEUX**

LES TECHNIQUES

Afin d'alléger le texte déjà très confus de cet exposé, nous rassemblons ici les descriptions ou les indications des diverses techniques les plus couramment employées dans ce travail.

Les solvants organiques ont tous été rectifiés avant d'être employés. L'alcool fut déshydraté par de la chaux vive, l'acétone par du chlorure de calcium et un peu de chaux, et l'éther par du sodium.

Les solutions ont toutes été concentrées dans le vide, à une température inférieure à 50°, dans des appareils entièrement en verre rodé (sans aucun joint de liège ou de caoutchouc). Les évaporations de petites quantités de solvants volatils ont été faites sous un jet d'azote pour éviter les oxydations au contact de l'air.

Les filtrations ont toutes été faites sur des filtres de verre poreux (filtres d'Iéna G4 et G3).

Toutes les fractions dont nous avons donné le poids ont été desséchées dans le vide, à la température ordinaire, en présence d'anhydride phosphorique jusqu'à poids constant.

Ne disposant le plus souvent que de quantités très petites de produits, nous avons dû faire appel à des micro-méthodes pour doser ou caractériser les éléments ou les composés qui nous intéressaient.

Les microdosages de l'azote ont été effectués par la méthode de Parnas et Wagner (143).

Le phosphore a été dosé par la microméthode de Machebœuf (104).

Le baryum a été dosé à l'état de sulfate,

Caractérisation et dosage colorimétrique du glycérol

Nous avons utilisé la réaction colorée de Denigès (35), le glycérol oxydé par l'eau de brome donne de la dioxyacétone qui, sous l'action de l'acide sulfurique concentré, se transforme en méthylglyoxal ; le méthylglyoxal donne avec la codéine une coloration vert canard intense.

On oxyde le produit à étudier, en le chauffant pendant 20 minutes dans un bain-marie bouillant avec 2 cm³ d'eau de brome à 0,3 cm³ p. 100 cm³. On chasse l'excès de brome à l'ébullition, puis on ajuste le volume de la solution à 2 cm³. On prélève 0,5 cm³ de la solution, on ajoute 2 gouttes d'une solution alcoolique de codéine à 5 p. 100 et 2 cm³ d'acide sulfurique, puis on porte le mélange dans un bain-marie bouillant pendant une minute.

La comparaison des intensités des colorations obtenues avec un poids connu du produit et avec 0,5 cm³ d'une solution de glycérol à 1 p. 1.000 permet d'effectuer un dosage colorimétrique approximatif du glycérol contenu dans le produit.

Avec 0,5 mg. de glycérol, on obtient une forte coloration ; mais on ne peut appliquer cette réaction qu'à des produits qui ne contiennent pas de quantité trop importante d'oses ou d'itols, car ces composés donnent également, dans ces conditions, des colorations variant du bleu au rouge qui masquent la teinte verte due au glycérol.

Caractérisation de l'inositol

Nous avons utilisé la réaction de Scherer : l'inositol oxydé par l'acide nitrique donne de l'acide rhodizonique que l'on caractérise à l'état de sel de baryum grâce à sa coloration rouge et à la fluorescence verte qu'il présente en lumière ultra-violette.

En appliquant la réaction comme suit, on obtient une réaction très nette avec 0,5 mg. d'inositol. Dans un tube à essai petit et court, on met quelques milligrammes du produit à examiner, « une tête d'épingle » d'acétate de baryum (ou de baryte) ⁽¹⁾ et 5 à 6 gouttes d'acide nitrique fumant. On chauffe doucement le tube dans la flamme d'un bec de gaz jusqu'à évaporation à sec de la solution ; puis, on continue à chauffer avec précaution au-dessus de la flamme jusqu'à ce qu'il se produise une réaction

(1) Le fait d'introduire une petite quantité de baryum avant l'oxydation sensibilise la réaction.

vive avec un dégagement de bioxyde d'azote et un boursofflement du résidu (Il est nécessaire de chauffer assez fortement tout en évitant une calcination). On chasse la petite quantité d'acide nitrique restant dans le résidu par un courant d'air chaud. La coloration rouge du rhodizonate de baryum apparaît déjà. On dissout le résidu dans 2 ou 3 gouttes d'eau, puis on ajoute quelques gouttes d'une solution d'acétate de baryum à 10 p. 100 pour transformer la totalité de l'acide rhodizonique en sel de baryum et pour « tamponner » la solution qui pourrait contenir encore quelque trace d'acide nitrique qui empêcherait la formation du rhodizonate de baryum. Suivant la quantité d'inositol contenu dans la prise d'essai, on obtient une coloration rose avec fluorescence verte qui est accompagnée ou non par la formation d'un précipité rouge ⁽²⁾.

Microdosages de glucides non réducteurs dans des substances lipidiques émulsionnables dans l'eau

Ayant à faire très fréquemment des dosages de glucides non réducteurs dans des quantités souvent petites de substances lipidiques, nous avons cherché à mettre au point une technique rapide permettant un dosage précis.

Pour doser ces glucides non réducteurs, il faut tout d'abord libérer les oses par une hydrolyse acide. Dans ce but, nous avons adapté la méthode de Fontès et Thivolle (51) (destinée à doser le glucose libre dans le sang) à ce dosage après hydrolyse acide. Dans cette technique, on détermine comparativement les pouvoirs réducteurs, d'une part, des oses à doser, d'autre part, d'une solution titrée de glucose ; il faut donc que ces oses et le glucose se présentent dans des conditions expérimentales identiques.

Les substances lipidiques que nous avons étudiées dans ce travail, donnent avec l'eau des émulsions (ou même des solutions). Nous avons donc ajouté 5 p. 100 d'acide sulfurique à ces émulsions et nous les avons hydrolysées par chauffage à l'autoclave à 120° pendant une heure (nous avons vérifié qu'un chauffage plus prolongé ne libérerait pas une plus grande quantité

(2) Pour une raison que nous ignorons, avec plusieurs de nos fractions, la coloration rouge du rhodizonate de baryum n'est apparue qu'après plusieurs heures.

d'oses). Après l'hydrolyse, les acides gras sont libérés et surnagent la solution. Nous les avons extrait par de l'éther.

Les oses sont alors en solution dans de l'acide sulfurique à 5 p. 100 qu'il est nécessaire de neutraliser avant de procéder au dosage. Nous avons neutralisé la presque totalité de l'acide sulfurique par une quantité légèrement insuffisante de lessive de soude, puis nous avons achevé cette neutralisation à l'aide de carbonate de sodium. (Tandis qu'un excès de soude aurait été néfaste, un léger excès de carbonate de sodium ne présente pas d'inconvénient, car le pouvoir réducteur est déterminé par, la suite, en présence de carbonate de sodium). Les oses sont donc dans une solution très riche en sulfate de sodium. Or, nous avons observé que le pouvoir réducteur des oses est modifié par la présence de ce sel (plus la solution est riche en sulfate de sodium plus le pouvoir réducteur est élevé). Il est donc nécessaire de déterminer le pouvoir réducteur de la solution titrée de glucose en présence de la même quantité de sulfate de sodium que les oses à doser. Nous avons tout d'abord vérifié que dans ces nouvelles conditions expérimentales le pouvoir réducteur de la solution est proportionnel à la quantité de glucose qu'elle contient. Nous avons donc traité la substance lipidique et le témoin de glucose titrée par la même quantité d'acide sulfurique ; puis, après hydrolyse à 120° ⁽³⁾, nous avons déterminé les pouvoirs réducteurs des deux solutions après les avoir neutralisées l'une et l'autre de la même façon par de la soude et du carbonate de sodium.

Technique. — Dans un tube à centrifuger jaugé à 2 cm³ (dans lequel se fera la totalité des opérations), on introduit la prise d'essai de la substance que l'on dissout dans 1 cm³ d'eau. Dans une deuxième tube identique au premier, on met 1 cm³ d'une solution titrée de glucose à 0,5 p. 1.000 ⁽⁴⁾. Dans un troisième tube on met 1 cm³ d'eau (il servira à faire un dosage « à blanc »). On ajoute dans chacun des trois tubes 0,5 cm³ d'acide sulfurique à 15 p. 100, puis on les chauffe à l'autoclave pendant une heure à 120°.

(3) Le chauffage du témoin de glucose à 120° en présence d'acide sulfurique à 5 p. 100 ne modifie nullement son pouvoir réducteur. Il est donc indifférent de le chauffer ou de ne pas le chauffer à 120°, seul le sulfate de sodium présent dans la solution après neutralisation agit sur le pouvoir réducteur.

(4) Cette solution titrée de glucose est stérilisée par la chaleur en milieu très légèrement acide et elle est conservée en ampoules scellées et stériles.

Dans le premier tube, on extrait les acides gras libérés, trois fois par de l'éther que l'on décante par aspiration. On chasse la petite quantité d'éther contenue dans la solution aqueuse en plongeant le tube dans un bain-marie chaud.

Pour neutraliser l'acide sulfurique, on ajoute à chacun des tubes 0,2 cm³ de lessive de soude (36°Bé). La solution est encore acide, on la neutralise par une solution saturée de carbonate de sodium que l'on ajoute goutte à goutte jusqu'à cessation de l'effervescence. On complète le volume de chacune des solutions à 2 cm³.

Les oses contenus dans la solution à titrer (1^{er} tube) et le glucose contenu dans le deuxième tube étant dans des milieux identiques, on procède au dosage du pouvoir réducteur selon la technique de Fontès et Thivolle. Cette méthode permet de doser de 0,5 mg. à 0,05 mg. d'oses avec une précision de l'ordre de 5 p. 100. Les résultats sont exprimés en glucose.

DETERMINATION DU POUVOIR HAPTENIQUE DE FIXATION DE L'ALEXINE

La réaction de fixation de l'alexine

(également dénommée réaction de déviation du complément)

Principe. — Dans le premier temps de la réaction on met en présence un anticorps, son antigène et de l'alexine en proportions convenables. L'antigène et l'anticorps se combinent spécifiquement pour former un complexe qui fixe l'alexine présente. Dans un deuxième temps, on introduit dans ce mélange des hématies et du sérum hémolytique pour ces hématies (et privé d'alexine par chauffage à 56°). L'alexine ayant été fixée, *les hématies ne sont pas lysées : la réaction est positive*, il y a eu fixation de l'alexine.

Si au contraire, on met en présence un anticorps avec une substance qui n'est pas son antigène, il n'y a pas combinaison et l'alexine n'est pas fixée. Lorsque l'on ajoute le mélange d'hématies et de sérum hémolytique, sous l'action combinée de l'alexine qui est restée libre, *les hématies sont lysées : la réaction est négative*, il n'y a pas eu fixation de l'alexine dans le premier temps de la réaction.

Les haptènes jouissent in vitro de la même propriété que les antigènes.

Pour doser le pouvoir hapténique d'une préparation, on effectue cette réaction avec des doses décroissantes de la préparation étudiée et l'on détermine ainsi la dose limite qui permet de fixer la totalité de l'alexine en présence de l'anticorps correspondant à l'haptène étudié. Cette détermination est sous la dépendance de nombreux facteurs expérimentaux (sérum contenant les anticorps, alexine, hématies de Mouton, sérum hémolytique, température et durée de la réaction) qu'il est nécessaire de fixer. Elle ne permet pas de faire un dosage absolu du pouvoir hapténique, mais seulement des mesures relatives dans des conditions expérimentales bien déterminées.

Les hématies de Mouton. — On utilise du sang de Mouton défibriné par agitation avec des billes de verre. On sépare les hématies par centrifugation, puis on les lave trois fois avec de l'eau physiologique (solution de chlorure de sodium à 9 p. 1.000) de façon à les débarrasser du sérum, puis, finalement, on les met en suspension dans un volume d'eau physiologique correspondant au volume initial du sang. Dans la réaction de fixation de l'alexine nous avons utilisé 0,25 cm³ de cette suspension diluée au dixième.

Le sérum hémolytique (de l'Institut Pasteur de Paris). — Nous avons utilisé le sérum d'un cheval (N° 98) ayant reçu une série d'injections d'hématies lavées de Mouton. Ce sérum, réparti dans des ampoules stériles, est chauffé à 56° pendant 30 minutes de façon à détruire l'alexine qu'il contient, puis il est conservé à la glacière.

Pour titrer le pouvoir hémolytique de ce sérum, on détermine la dose minima qui permet d'hémolyser 0,25 cm³ d'hématies de Mouton correspondant à du sang dilué au 1/10^{me}, en présence de 2,5 doses minima d'alexine (voir ci-dessous). Après un séjour de 30 minutes dans une étuve à 37°. Dans la réaction de fixation de l'alexine, nous avons employé 5 doses minima hémolytiques (connaissant la dose minima, on calcule la dilution à laquelle il faut amener ce sérum pour que 0,25 cm³ de ce sérum dilué renferme 5 doses minima hémolytiques ; nous avons utilisé le sérum du cheval N° 98 après l'avoir dilué au 1/50^{me}).

Le pouvoir hémolytique de ce sérum conservé à la glacière étant sensiblement fixe, nous avons vérifié son titre seulement tous les deux mois. Nous n'avons pas d'ailleurs noté de modification appréciable après trois années de conservation.

L'alexine. — Nous avons utilisé, comme source d'alexine, du sérum frais de cobaye sain.

On prélève le sang par ponction cardiaque. On le laisse se coaguler à la température du laboratoire pendant trois heures ⁽⁵⁾, puis on sépare le sérum.

Pour titrer le pouvoir alexique de ce sérum, on le dilue au 1/100^{me}. Dans une série de sept tubes, on introduit des quantités croissantes du sérum dilué : 0,2 cm³, 0,3 cm³, 0,8 cm³. On ajoute à chacun des tubes 0,25 cm³ de sérum hémolytique dilué (contenant 5 doses minima hémolytiques) et 0,25 cm³ de suspension d'hématies correspondant à du sang dilué au 1/10^{me}. On complète le volume des tubes à 1,25 cm³ par addition d'eau physiologique. Après un séjour de 30 minutes dans une étuve à 37°, on note le premier tube dans lequel l'hémolyse des hématies est totale. Ce tube renferme donc la dose minima d'alexine : soit ici (voir le tableau suivant) le tube N° 5 qui contient 0,6 cm³ de sérum de cobaye dilué au 1/100^{me}.

Numéro des tubes	Sérum de cobaye dilué à 1/100	Sérum hémolytique dilué à 1/50 (5 doses min.)	Suspen- sion d'hé- maties dilnée à 1/10	Eau physio- logique	Résultats Hémolyse
1	0,2	0,25	0,25	0,6	Nulle
2	0,3	»	»	0,5	Partielle
3	0,4	»	»	0,4	Incomplète
4	0,5	»	»	0,3	Incomplète
5	0,6	»	»	0,2	Totale
6	0,7	»	»	0,1	Totale
7	0,8	»	»	0	Totale
8	0	0,25	»	0,75	Nulle
9	0,8	0	»	0,2	Nulle

Titration de l'alexine

Le tube témoin N° 8 permet de vérifier que le sérum hémolytique ne contient pas d'alexine et le tube témoin N° 9 permet

(5) Avant de titrer l'alexine, il est nécessaire d'attendre qu'il se soit écoulé trois heures depuis le moment de la prise de sang, car c'est seulement après ce délai que le pouvoir alexique atteint une valeur stable qui se maintient pendant 2 ou 3 jours.

de s'assurer que le sérum de cobaye ne possède pas de pouvoir hématytique pour les hématies de Mouton.

Dans la réaction de fixation de l'alexine, nous avons employé 2,5 doses minima d'alexine. Désirant que ces 2,5 doses soient contenues dans un volume de 0,25 cm³, nous avons dilué le sérum de cobaye à 1/16^{me} (dans le cas présent).

D'une part, le pouvoir alexique des sérums de cobaye varie d'un individu à l'autre, d'autre part, il est très fragile ; il est donc nécessaire de prélever et de doser ce sérum le jour même de l'emploi.

L'anticorps. — Nous avons utilisé le sérum d'un cheval ayant reçu des injections de Bacilles tuberculeux tués par la chaleur (Sérum antituberculeux de l'Institut Pasteur de Paris, Cheval N° 65). Ce sérum est chauffé à 56° pendant 30 minutes pour détruire l'alexine, puis il est conservé à la glacière en ampoules stériles. Nous avons utilisé ce sérum antituberculeux après l'avoir dilué au 1/10^{me}.

L'haptène. — Pour pouvoir doser le pouvoir hapténique d'une substance, il faut tout d'abord la mettre en émulsion (ou en solution) dans de l'eau physiologique.

Si la substance est soluble dans l'eau, la chose est très simple, et l'on obtient d'excellents résultats avec ces solutions homogènes et bien constantes (c'est le cas de nos préparations les plus actives), mais si la substance est insoluble dans l'eau, il faut la dissoudre dans un solvant miscible avec l'eau (tel l'alcool), puis, faire à partir de cette solution, une émulsion fine par addition très progressive d'eau physiologique. Cette mise en émulsion a une *très grande* importance, car le pouvoir hapténique est fonction de la dimension des particules de l'émulsion (plus ces particules sont petites, plus le pouvoir hapténique est élevé). Les résultats sont donc beaucoup moins précis dans ce deuxième cas.

Détermination du pouvoir hapténique

La réaction de fixation de l'alexine

Nous avons mesuré le pouvoir hapténique de nos préparations en déterminant pour chacune d'elles la quantité minima qui est encore capable de fixer complètement en une heure à 37°, 2,5 doses minima d'alexine en présence d'une même sérum antituberculeux dilué à 1/10^{me}, chaque dose minima d'alexine étant

capable de lyser en 30 minutes à 37°, en présence de 5 doses minima hémolytiques, 0,25 cm³ d'une suspension d'hématies de Mouton correspondant à du sang dilué au 1/10^{me}.

Il faut donc faire, pour chaque préparation étudiée, une série de réactions avec des doses décroissantes. Nous avons obtenu ces doses décroissantes en diluant progressivement la solution (ou l'émulsion) de la substance étudiée. Nos préparations étant très actives, nous avons pris comme solution unité, une solution contenant par cm³ 1 mg. de produit. Afin d'éviter de trop grosses erreurs dues à des dilutions répétées, nous avons tout d'abord préparé par dilutions successives, à partir de la solution unité 1/1, des solutions à 1/10^{me}, 1/100^{me} et 1/1.000^{me} ; nous avons alors préparé les dilutions intermédiaires à partir de ces trois solutions mères ⁽⁶⁾.

Premier temps de la réaction. — On met dans une série de tubes 0,25 cm³ des solutions hapténiques par ordre de dilution croissante, puis 0,25 cm³ de sérum antituberculeux dilué au 1/10^{me} et enfin 0,25 cm³ de sérum frais de cobaye dilué à 1/16^{me} (2,5 doses minima d'alexine). On mélange, puis on met les tubes dans une étuve à 37° pendant une heure. L'anticorps et l'haptène se combinent pour former un complexe qui fixe l'alexine.

Deuxième temps de la réaction. — On ajoute à chacun des tubes 0,25 cm³ de la suspension d'hématies (correspondant à du sang dilué au 1/10^{me}) et 0,25 cm³ de sérum hémolytique dilué à séjour de 30 minutes dans l'étuve à 37°, on note le dernier tube dans lequel il n'y a pas trace d'hémolyse : soit ici (voir le tableau suivant) le tube N° 6. Ce tube contient la dose minima d'haptène nécessaire pour fixer totalement 2,5 doses minima d'alexine en présence de sérum antituberculeux dans les conditions expérimentales que nous venons de décrire. Nous donnons comme exemple dans le tableau suivant, le protocole d'une détermination.

(6) Il est de la plus haute importance, lorsque l'on prépare ces solutions, de ne jamais plonger dans une solution diluée, une pipette ayant été au contact d'une solution plus concentrée. Avec des quantités aussi faibles de substances qui sont très adsorbables, les phénomènes d'adsorption sur les parois des pipettes fausseraient les dilutions. Il faut donc prendre une nouvelle pipette chaque fois que l'on passe d'une solution à une solution plus diluée.

N° des tubes	Solution hapténique unité diluée (0,25 cm ³)	Sérum antituberculeux dilué à 1/10	Alexine 2,5 doses minima	Suspension d'hématies à 1/10	Sérum hémolytique 5 doses minima	Résultat (1)
1	1/10	0,25 cm ³	0,25 cm ³	0,25 cm ³	0,25 cm ³	+++
2	1/50	»	»	»	»	+++
3	1/100	»	»	»	»	+++
4	1/200	»	»	»	»	+++
5	1/500	»	»	»	»	+++
6	1/800	»	»	»	»	+++
7	1/1.000	»	»	»	»	++
8	1/1.500	»	»	»	»	+
9	1/2.000	»	»	»	»	—
10	1/3.000	»	»	»	»	—
témoins (2)						
11	1/10	0	»	»	»	+++
12	1/50	0,25	»	»	»	—
13	1/100	0	»	»	»	—
14	0	0	»	»	»	—

←—————→

1 h. à 37°

—————→

30 minutes à 37°

Détermination d'un pouvoir hémolytique

Nous avons exprimé le pouvoir hapténique de nos préparations par la dilution de la solution hapténique contenue dans le tube renfermant la dose minima d'haptène (Il ne s'agit pas d'une dilution absolue, mais de la dilution à laquelle on porte une solution contenant 1 mg. de substance par cm³). Nous avons

(7) Signification des symboles : +++ pas trace d'hémolyse, ++ début d'hémolyse, + hémolyse presque totale, — hémolyse totale.

(8) Les témoins. Les tubes 11, 12 et 13 servent à déterminer le « pouvoir antialexique » de la solution hapténique (fixation de l'alexine par la solution hapténique seule, en l'absence de sérum antituberculeux). Ici, seul le tube 11 présente un pouvoir antialexique. Le tube 14 permet de vérifier que le sérum antituberculeux ne possède pas de « pouvoir empêchant » (fixation de l'alexine par le sérum antituberculeux seul, en l'absence d'haptène).

désigné ce pouvoir hapténique par la lettre **H** : soit ici $\mathbf{H} = 1/800^{\text{me}}$. Le pouvoir hapténique est donc proportionnel au dénominateur de la fraction qui exprime la dilution limite.

Seules les déterminations de pouvoir hapténique effectuées dans une même série avec les mêmes hématies de Mouton et la même alexine, sont directement comparables. Bien que nous ayons dosé, pour chaque série de déterminations, l'alexine en présence des hématies qui servent à faire les réactions de fixation, et, que nous ayons employé un même sérum antituberculeux et un même sérum hémolytique, nous avons observé d'une série à l'autre des variations apparemment inexplicables des pouvoirs hapténiques. Afin de pouvoir comparer les valeurs obtenues dans les différentes séries de déterminations, nous avons joint à chaque série le titrage d'une solution hapténique donnée prise comme étalon. Nous avons utilisé dans ce but de « l'antigène méthylique » préparé par l'Institut Pasteur selon la technique de Nègre et Boquet (voir page 49). Cette solution de substance hapténique dans l'alcool méthylique se conserve très bien si l'on a soin de la mettre à l'abri de l'air et de la lumière.

CHAPITRE I

EXTRACTION DE L'HAPTÈNE LIPOÏDIQUE CONTENU DANS LES BACILLES TUBERCULEUX

PLAN DU CHAPITRE I

LA MATIERE PREMIERE : les « Bacilles de la Tuberculine »

**EXTRACTION DE L'HAPTÈNE LIPOÏDIQUE CONTENU DANS
LES « BACILLES DE LA TUBERCULINE »**

Eléments du problème, les difficultés rencontrées.....

Quelques propriétés de l'haptène lipoidique étudiées au
cours des essais préliminaires.....

Solubilité de l'haptène dans l'eau :

1^o) de l'haptène contenu dans les phosphatides ;

2^o) de l'haptène contenu dans les « Bacilles de la
Tuberculine ».

(Essai quantitatif sur 100 grammes. Influence
du lavage préalable sur le rendement en haptène).

Affinité de l'haptène pour l'eau en présence d'éther.

Insolubilité de l'haptène dans l'acétone bouillante.

Lavage des solutions étherées de l'haptène avec de
l'eau salée en présence d'acétone.

**EXTRACTION DE L'HAPTÈNE LIPOÏDIQUE A PARTIR DE
12 Kgs de « BACILLES DE LA TUBERCULINE ».**

1. Extraction acétonique

Déshydratation et extraction par l'acétone froide.

Extraction par l'acétone chaude.

2. Extraction alcoolique

3. Elimination des substances non lipidiques contenues dans
l'extract alcoolique : traitement par l'eau, l'éther,
l'acétone et le chlorure de sodium

4. Extraction de l'haptène lipoidique par l'éther

5. Elimination des « cires » par l'acétone bouillante

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS DU CHAPITRE I

Nouvelle méthode d'extraction de l'haptène lipoidique contenu dans
les « Bacilles de la Tuberculine »

LA MATIERE PREMIERE

« Les Bacilles de la Tuberculine »

Malgré les dénaturations considérables que subissent les Bacilles tuberculeux lorsqu'on les stérilise par chauffage à 120°, l'haptène lipoidique n'est pas détruit après un tel traitement. Nous avons donc utilisé le résidu de fabrication de la Tuberculine de l'Institut Pasteur de Paris, matière première que nous pouvions avoir à notre disposition en grande quantité ⁽¹⁾.

Cette Tuberculine est fabriquée à partir d'un mélange en partie égales de huit souches de bacilles tuberculeux humains et bovins (Test, Marmorek, C₁, L. A., B. B., Cheval, Behring et Vallée) que l'on cultive dans des ballons de 250 cm³ sur bouillon de veau peptoné, glycérolé et salé (veau : 500 p. 1.000, peptone 10 p. 1.000, glycérol 5 p. 100, ClNa 5 p. 1.000). On entretient la virulence de ces souches isolées depuis longtemps (de 1896 à 1913) en les repiquant tous les mois sur pomme de terre glycérolée.

Après un séjour de six semaines dans des étuves à 37°, les cultures se présentent sous la forme d'un voile épais et plissé de couleur crème. Après stérilisation des cultures à l'autoclave par chauffage à 120° pendant une heure, on verse le contenu des ballons (bacilles et milieu de culture) dans des écuelles en porcelaine, puis on chauffe le tout sur bain de vapeur jusqu'à réduction du volume au 1/10^e. Du résidu coloré en brun et très visqueux (il contient environ 50 p. 100 de glycérol), on sépare les bacilles par filtration sur papier, puis par expression à l'aide d'une presse à main. Le filtrat représente la Tuberculine brute, tandis que les corps bacillaires représentent notre matière première. Il faut environ 600 ballons de culture pour avoir 1 kg. de bacilles pesés à cet

(1) Nous tenons à remercier ici bien vivement le personnel du Service de la Tuberculine de l'Institut Pasteur de Paris qui a récolté aimablement pour nous tous les bacilles utilisés dans ce travail.

état; nous en avons utilisé au total dans ce travail 50 kgs qui représentent donc la récolte de 30.000 ballons environ. Après un tel traitement qui a fait apparaître un pigment brun rouge, les protéïdes bacillaires sont profondément dénaturés et les lipides partiellement oxydés; cependant la totalité de l'haptène lipoidique subsiste. Les corps bacillaires sont complètement englués de milieu de culture concentré et forment une masse collante. Nous les dénommons « *Bacilles de la Tuberculine* ».

Les corps bacillaires pesés après lavage et dessiccation représentent $1/5^{\text{me}}$ environ du poids des « *Bacilles de la Tuberculine* ».

Le fait d'employer ces corps bacillaires dénaturés par la chaleur, a compliqué notre travail ; mais comme nous disposions de grosses masses de bacilles, qu'il aurait été long et onéreux de cultiver spécialement pour notre travail, nous les avons utilisés puisque la propriété biologique qui nous intéresse n'est pas modifiée.

EXTRACTION DE L'HAPTÈNE LIPOÏDIQUE DE FIXATION DE L'ALEXINE CONTENU DANS LES « BACILLES DE LA TUBERCULINE »

Nous n'avons pas extrait l'haptène lipoiidique contenu dans les 50 kilogs de bacilles utilisés dans ce travail, en une seule fois, ni à l'aide d'une méthode unique. Cette masse importante de matière première a fait l'objet de toute une série d'extractions effectuées à l'aide de procédés que nous avons modifiés progressivement. A chaque étape, connaissant un peu mieux les propriétés de l'haptène lipoiidique et des substances inactives qui l'accompagnent, nous avons tenté de perfectionner la méthode d'extraction de la substance hapténique. Notre but était d'obtenir l'haptène lipoiidique sous la forme d'une préparation la plus active possible, avec un rendement maximum et à partir de grandes quantités (plusieurs kilogrammes) de bacilles ⁽²⁾. Nous avons vu que l'haptène lipoiidique du Bacille tuberculeux accompagne les phosphatides. Il semble donc que le procédé le plus simple et le plus rapide consiste à traiter directement les « Bacilles de la Tuberculine » par de l'alcool, puis à séparer ces phosphatides contenus dans l'extrait alcoolique grâce à leur solubilité dans l'éther et à leur insolubilité dans l'acétone. Nous avons en effet employé tout d'abord cette technique théorique-ment très simple, mais lors de sa réalisation, nous nous sommes heurtée à de grosses difficultés d'ordre pratique. L'alcool enlève aux « Bacilles de la Tuberculine » qui sont enrobés par le milieu de culture concentré, une quantité considérable de substances

(2) En effet une technique peut donner d'excellents résultats lorsque l'on traite 100 g. de bacilles, mais elle n'est pas toujours applicable à l'extraction de 10 kg de matière première. La manipulation de grosses masses de bacilles fait apparaître toute une série de difficultés d'ordre matériel (emploi d'énormes volumes de solvants organiques onéreux, pénétration très lente des grandes quantités de matière par les solvants, centrifugation de plusieurs litres de liquides et de plusieurs kilogrammes de bacilles, impossible avec les appareils dont nous disposons, etc...).

dont il est très difficile ensuite de séparer l'haptène lipoïdique. On est tout d'abord gêné par la présence d'une partie très importante du milieu de culture (surtout par le glycérol) ; la solution alcoolique évaporée à sec laisse un résidu sirupeux d'où l'on extrait très difficilement les phosphatides par l'éther. D'autre part, la solution alcoolique renferme le groupe des lipides que nous avons désignés par le terme « graisses acétono-solubles ». Ces graisses très abondantes sont dépourvues de toute activité hapténique, mais lorsque l'on cherche à en séparer les phosphatides grâce à leur insolubilité dans l'acétone, une fraction de ces phosphatides accompagnés d'haptène reste en solution dans l'acétone. Les phosphatides sont insolubles dans l'acétone pure, mais ils se dissolvent partiellement dans les solutions acétoniques de lipides ; c'est pourquoi il est pratiquement impossible de séparer quantitativement les lipides phosphorés d'avec une grande quantité de « graisses acétono-solubles ».

Enfin, l'alcool froid n'extrait pas la totalité de l'haptène lipoïdique ; il est donc nécessaire, pour avoir un bon rendement en haptène, de traiter les bacilles par l'alcool bouillant. Mais alors, au moment du refroidissement de la solution alcoolique, une partie de l'haptène précipite avec une masse considérable de substances cireuses. La séparation de la substance hapténique véritablement noyée dans les « cires » est ensuite une opération très longue et malaisée.

Avant d'extraire les phosphatides et l'haptène lipoïdique par l'alcool, il faudrait donc priver les « Bacilles de la Tuberculine » du milieu de culture, des « graisses acétonosolubles » et des « substances cireuses » dont la présence est si gênante dans l'extrait alcoolique. Mais il est difficile d'éliminer ces substances qui, par elles-mêmes, sont dépourvues d'activité hapténique, sans entraîner d'haptène lipoïdique.

Nous n'exposerons pas en détails les nombreux essais que nous avons effectués pour tenter de résoudre ces multiples problèmes, mais, au cours de ces tâtonnements successifs, nous avons étudié un certain nombre des propriétés de l'haptène lipoïdique, et la connaissance de ces propriétés nous a permis de perfectionner progressivement notre première technique d'extraction. Nous décrirons seulement la méthode d'obtention de la préparation hapténique qui a fait l'objet des dernières recherches chimiques décrites dans ce travail. Mais au préalable, nous indiquons les propriétés essentielles de l'haptène lipoïdique, propriétés qui ont guidé le choix de cette méthode.

Quelques propriétés de l'Haptène Lipoïdique étudiées au cours des essais préliminaires

I. — Solubilité de l'haptène lipoïdique dans l'eau

1° SOLUBILITÉ DE L'HAPTÈNE LIPOÏDIQUE CONTENU DANS LES PHOSPHATIDES

Si l'on traite les « Bacilles de la Tuberculine » par de l'alcool et si l'on sépare les phosphatides contenus dans la solution alcoolique (grâce à leur solubilité dans l'éther et à leur insolubilité dans l'acétone), on obtient des phosphatides bruts qui renferment l'haptène lipoïdique. Ces phosphatides sont très hygroscopiques ; mis au contact de l'eau, ils se gonflent rapidement et donnent une solution légèrement trouble et très visqueuse ⁽³⁾.

Nous avons vu, dans l'étude historique, que certains auteurs affirment que l'haptène lipoïdique extrait par l'alcool à partir de Bacilles tuberculeux ou à partir de leur milieu de culture est insoluble dans l'eau. Nous constatons au contraire dans notre préparation où la substance hapténique accompagne les phosphatides que *l'haptène lipoïdique est sous une forme hydrosoluble*. Il suffit d'éliminer les « graisses acétonosolubles » et les « cires » contenues dans l'extrait alcoolique pour mettre clairement ce fait en évidence.

2° SOLUBILITÉ DANS L'EAU DE L'HAPTÈNE LIPOÏDIQUE CONTENU DANS LES « BACILLES DE LA TUBERCULINE »

Nous avons vu également, dans l'étude historique, que l'haptène lipoïdique n'est pas libre dans les Bacilles tuberculeux vivants, mais qu'il s'y trouve vraisemblablement à l'état de cénapse lipidoprotéidique. Les propriétés de solubilité de ce cénapse sont donc probablement différentes de celles de l'haptène libre. En effet, on peut laver des bacilles vivants avec de l'eau sans entraîner une quantité appréciable d'haptène lipoïdique.

Mais les « Bacilles de la Tuberculine » se comportent d'une manière très différente. Dès qu'on les met en contact avec de

(3) Nous discuterons plus loin s'il s'agit d'une solution vraie d'un sol colloïdal ou d'une émulsion ; quoiqu'il en soit, l'haptène lipoïdique est dans ce liquide aqueux.

l'eau, l'haptène lipoidique s'y dissout rapidement et si l'on prolonge et multiplie les lavages, on l'extrait totalement. On peut donc supposer que la stérilisation, puis la « cuisson » que subissent les « Bacilles de la Tuberculine » décomposent le cénopse lipidoprotéidique. L'haptène lipoidique libéré est alors très soluble dans l'eau et y diffuse assez rapidement.

L'extrait alcoolique des corps bacillaires lavés rapidement contient encore de l'haptène lipoidique, mais en quantité moindre que l'extrait alcoolique des « Bacilles de la Tuberculine » non lavés.

Pour comprendre et expliquer ces faits imprévus que nous avons observés au cours de plusieurs tentatives de lavage des « Bacilles de la Tuberculine », nous avons effectué un essai quantitatif avec 100 grammes de matière première.

ESSAIS QUANTITATIFS

AVEC 100 G. DE « BACILLES DE LA TUBERCULINE »

On lave rapidement 100 grammes de « Bacilles de la Tuberculine » 5 fois, avec 150 cm³ d'eau chaque fois.

On étudie l'haptène lipoidique contenu dans les corps bacillaires lavés. Pour cela, on déshydrate tout d'abord les corps bacillaires trois fois à l'aide d'acétone à 15° (l'acétone extrait également des lipides, mais ne dissout pas d'haptène). On traite ensuite le résidu bacillaire trois fois par de l'alcool bouillant que l'on filtre après refroidissement. L'haptène se trouve en presque totalité dans la solution alcoolique. On extrait le résidu d'évaporation de la solution alcoolique par de l'éther, puis on précipite les phosphatides au moyen d'acétone. On purifie le précipité par une deuxième précipitation à partir de sa solution étherée par de l'acétone. On obtient 290 mg. de phosphatides qui possèdent une activité hapténique $H = 1/500$ ⁽⁴⁾

Le poids et l'activité de cette préparation sont plus faibles que ceux des phosphatides extraits, par une méthode analogue, à partir d'une égale quantité de « Bacilles de la Tuberculine ». Une partie de l'haptène lipoidique a donc été extraite par les

(4) Nous rappelons que nous exprimons le pouvoir hapténique H de nos préparations par la dilution limite à laquelle on peut porter une solution contenant 1 mg. de substance par cm³ pour que 0,25 cm³ de cette solution diluée fixe encore complètement 2,5 dose minima d'alexine en présence de sérum antituberculeux. L'activité hapténique H est donc inversement proportionnelle à la dilution.

eaux de lavages des corps bacillaires. Mais, dans cet extrait aqueux, sous quelle forme la substance hapténique existe-t-elle ?

Afin de séparer la substance hapténique, on évapore les eaux de lavage à sec, puis on traite le résidu d'évaporation trois fois par de l'alcool bouillant (on sépare chaque fois l'extrait alcoolique après refroidissement). Les solutions alcooliques renferment l'haptène lipoidique. On les évapore à sec ; elles laissent un résidu sirupeux riche en glycérol. On dissout le résidu dans de l'alcool absolu, on élimine une petite quantité de substances insolubles et dépourvues d'haptène, puis on précipite une grande partie du glycérol par addition d'éther. On concentre la solution éthéro-alcoolique et on l'extrait à nouveau trois fois par de l'éther. On concentre les extraits éthérés et on précipite l'haptène lipoidique par addition d'acétone. On purifie le précipité par deux précipitations au moyen d'acétone à partir de ses solutions dans le chloroforme, puis dans l'éther. On obtient 40 mg. d'une préparation qui possède une activité hapténique élevée $H = 1/1.000$. Cette préparation soluble dans l'éther et le chloroforme et insoluble dans l'acétone, donne avec l'eau une émulsion visqueuse et trouble ; elle contient du phosphore (3 p. 100) et libère par hydrolyse des acides gras. Bien que obtenue à partir d'un extrait aqueux, cette préparation ne libère par hydrolyse acide qu'une petite quantité d'oses (3 p. 100). Elle présente donc les propriétés des phosphatides hapténiques extraits à partir des corps bacillaires et elle possède une composition analogue.

On peut donc extraire l'haptène lipoidique contenu dans les « Bacilles de la Tuberculine » directement par de l'eau. Dans l'extrait aqueux, l'haptène lipoidique accompagne également des phosphatides comme dans les extraits alcooliques des corps bacillaires.

INFLUENCE DU LAVAGE DES « BACILLES DE LA TUBERCULINE » SUR LE RENDEMENT EN HAPTÈNE LIPOÏDIQUE EXTRAIT DES CORPS BACILLAIRES

Au cours de divers essais, nous avons extrait par des méthodes analogues, l'haptène lipoidique contenu dans les « Bacilles de la Tuberculine », soit directement sans les soumettre à aucun lavage, soit après des lavages rapides ou prolongés.

Ces diverses extractions ont été effectuées à partir de plusieurs kilogrammes de bacilles. Dans le tableau suivant nous in-

diquons seulement les résultats que nous avons obtenus (ces résultats sont rapportés pour chaque essai à 1 Kg de « Bacilles de la Tuberculine »).

LAVAGE DES BACILLES	Phosphatides extraits par l'alcool	
	Poids pour 1 kg. de Bac. de la tuberculine	Activité hapténique (5)
Bacilles non lavés (Extraction N° 1 ..	4 g.	1/700
(Extraction N° 2 ..	4,8 g.	1/600
Bacilles lavés 5 fois pendant 2 heures	2,9 g.	1/500
Bacilles lavés 10 fois pendant une semaine.	0,25 g.	1/100

On voit donc qu'un lavage, même rapide, des « Bacilles de la Tuberculine » s'accompagne d'une diminution importante de la quantité de phosphatides extraits des corps bacillaires par l'alcool, et de leur activité sérologique.

L'essai quantitatif décrit plus haut permet d'interpréter facilement ces faits.

Dans les Bacilles tuberculeux vivants, les phosphatides et l'haptène lipoidique sont à l'état de cénapses (probablement lipodprotéidique). Sous l'action de la chaleur ces cénapses sont décomposés ; les phosphatides et l'haptène lipoidique sont alors libres et de ce fait très solubles dans l'eau. Un lavage, même rapide, des corps bacillaires chauffés, extrait une quantité importante de phosphatides et d'haptène. L'extrait alcoolique des corps bacillaires lavés n'en renferme plus alors qu'une partie.

Nous avons vu que l'on peut séparer ce même haptène lipoidique accompagné de phosphatides à partir des eaux de lavage. La préparation hapténique obtenue à partir de l'extrait aqueux est même très active ($H = 1/1.000$). Cependant nous n'avons pas utilisé cette méthode pour obtenir l'haptène lipoidique, car

(5) Ces valeurs ne sont pas directement comparables à celles données dans la suite de ce travail car elles ont été déterminées à l'aide d'un sérum antituberculeux différent.

sa séparation, à partir de la solution aqueuse, est difficile, longue et incomplète et exige l'emploi de volumes considérables de solvants organiques.

Il est intéressant de remarquer que, au cours de toutes ces opérations : (chauffage des bacilles, extraction par l'eau, extraction par l'alcool), les phosphatides et l'haptène lipoïdique subissent des actions parallèles. Ceci permet déjà de penser que leurs molécules ont, dans les bacilles vivants et dans les extraits, des propriétés très voisines.

II. — Affinité de l'haptène lipoïdique pour l'eau en présence d'éther

Les phosphatides hapténiques sont très solubles dans l'éther. Mais lorsque l'on cherche à laver les solutions éthérées avec de l'eau, afin d'éliminer les substances non lipoïdiques, il se forme tout d'abord des émulsions considérables. Avec certaines préparations ces émulsions sont telles que l'on ne peut plus distinguer les phases éthérée et aqueuse ; on obtient une masse d'aspect homogène formant une gelée transparente et consistante, même lorsque le volume de l'éther est double de celui de l'eau. Si on évite une agitation trop vive, on arrive à casser les émulsions grâce à l'addition d'une petite quantité d'alcool et à une centrifugation énergique. Mais alors, on constate qu'une grande partie des phosphatides hapténiques se trouve dans la phase aqueuse où ils sont même légèrement plus actifs que ceux qui sont restés dans la phase éthérée.

Phase éthérée : poids 65 p. 100. Activité hapténique $H = 1/700$

Phase aqueuse : » 35 p. 100. » » $H = 1/800$

L'affinité de l'haptène lipoïdique pour l'eau est telle qu'il est pratiquement impossible de laver sa solution éthérée avec de l'eau.

III. — Insolubilité de l'haptène lipoïdique dans l'acétone bouillante

Les « substances cireuses » contenues dans les Bacilles tuberculeux sont en grande partie solubles dans l'acétone chaude d'où elles précipitent par refroidissement. Nous avons donc essayé d'éliminer les « cires » qui pouvaient souiller les phosphatides en traitant ces derniers par de l'acétone bouillante.

On pulvérise soigneusement 203 mg. de phosphatides bruts, puis on les extrait par de l'acétone bouillante renouvelée une dizaine de fois. Pendant chaque extraction, on maintient l'ébullition pendant quelques minutes avant de séparer la solution acétonique bouillante par filtration sur un filtre chauffé. L'extrait acétonique précipite en grande partie par refroidissement et renferme 34 mg. de « substances cireuses » qui ne possèdent qu'une très faible activité hapténique.

	Poids	Activité hapténique
Soluble dans l'acétone bouillante :	16 p. 100.	$H = 1/100$
Insoluble dans l'acétone bouillante :	84 p. 100.	$H = 1/1000$

moins du cinquantième de l'activité totale est ainsi dissoute par l'acétone bouillante.

L'haptène lipoidique est donc pratiquement insoluble dans l'acétone bouillante ⁽⁶⁾.

IV. — Lavage des solutions éthérées avec de l'eau salée en présence d'acétone

Nous avons vu qu'il est pratiquement impossible de laver la solution éthérée des phosphatides hapténiques, car, d'une part, il se forme des émulsions très stables, et, d'autre part, l'haptène lipoidique passe en grande partie dans la phase aqueuse. Il est cependant indispensable d'effectuer ce lavage pour éliminer les substances non lipoidiques entraînées par les phosphatides. Nous avons donc cherché à casser les émulsions tout en diminuant la solubilité de l'haptène dans l'eau.

Connaissant la très grande insolubilité de nos préparations dans l'acétone, nous avons tenté de résoudre ce double problème en ajoutant de l'acétone à l'eau et à l'éther en présence. Dans ces conditions, l'émulsion se brise, mais une partie de l'haptène reste encore dans la phase aqueuse. Nous avons alors associé l'action précipitante des sels neutres sur les phosphatides. (Nous avons choisi ici le chlorure de sodium à cause de sa grande solubilité dans les mélanges d'acétone et d'eau). Grâce à l'action combinée de l'acétone et du chlorure de sodium la phase aqueuse ne renferme alors plus trace d'activité hapténique.

(6) Si l'haptène est à l'état de préparation un peu plus purifiée, la solubilité dans l'acétone chaude est encore plus faible. La très petite solubilité constatée ici est due uniquement à l'entraînement en solution dans l'acétone par des impuretés solubles dans ce solvant.

Après quelques essais nous avons été amenée à employer les proportions suivantes qui nous ont donné d'excellents résultats.

Eau	2 volumes
Ether	3 volumes
Solution de ClNa à 18 p. 100	1 volume
Acétone	3 volumes

(le volume de la phase éthéro-acétonique est un peu plus grand que celui de la phase hydroacétonique). On dissout les phosphatides dans l'eau, puis on les agite vigoureusement avec l'éther ; le contact entre les deux phases est excellent grâce à l'émulsion formée. L'addition de la solution de chlorure de sodium ne la brise que partiellement. On ajoute alors l'acétone ; l'émulsion disparaît totalement et l'on voit apparaître un précipité important qui se rassemble très rapidement à la surface de séparation des phases hydroacétonique et éthéroacétonique parfaitement limpides, nous le dénommons « *précipité intermédiaire* ».

Le « précipité intermédiaire » renferme la plus grande partie et des phosphatides et de l'activité hapténique de la préparation initiale ; la phase éthéro-acétonique moins active contient le reste. La phase hydroacétonique salée, au contraire, ne possède pas trace d'haptène lipoïdique.

Exemple :

« Précipité intermédiaire »	poids 1 g. H : 1/1.000
Phase éthéro-acétonique	» 0,2 g. H : 1/500
Phase hydro-acétonique salée	» 0,1 g. H : néant.

L'action combinée de l'eau, de l'éther, de l'acétone et du chlorure de sodium permet donc de réaliser le lavage aqueux des phosphatides hapténiques avec un rendement parfait.

EXTRACTION DE L'HAPTENE LIPOIDIQUE A PARTIR DE 12 Kg. DE BACILLES DE LA TUBERCULINE

Nous avons vu qu'un lavage, même rapide, des « Bacilles de la Tuberculine » entraîne une diminution de la quantité d'haptène lipoidique extrait des corps bacillaires par l'alcool. Nous nous sommes donc abstenue de laver les 12 Kg. de matière première traités dans cette expérience.

Avant d'extraire les bacilles avec de l'alcool, il est préférable de leur enlever le maximum d'eau qui diluerait le solvant et favoriserait l'entraînement d'une grande quantité de substances non lipidiques dans l'extrait alcoolique. Or, la déshydratation de 12 Kg. de matière collante est pratiquement impossible avec les desséchants habituels (acide sulfurique, chlorure de calcium, etc....). D'autre part, nous avons vu combien la présence de glycérol, de « graisses acétono-solubles » et de « cires » dans l'extrait alcoolique gêne considérablement la séparation de l'haptène lipoidique. Grâce à la très grande insolubilité de la substance hapténique dans l'acétone et grâce à une extraction progressive des bacilles par de l'acétone froide d'abord, puis chaude, nous avons pu enlever l'eau, les « graisses acétono-solubles », une grande partie des « cires » et le glycérol sans entraîner d'haptène dans les solutions acétoniques. La présence d'eau et de lipides dans l'acétone augmente la solubilité des phosphatides ; c'est pourquoi nous avons extrait la matière première tout d'abord par de l'acétone froide. A froid l'acétone déshydrate les bacilles, extrait une grande partie des « graisses acétono-solubles » et dissout une partie du glycérol. L'action ultérieure de l'acétone chaude permet alors d'enlever la majeure partie des « cires » et le reste du glycérol sans dissoudre d'haptène.

I. — Extraction acétonique

a) Déshydratation et extraction par de l'acétone froide

On met les « Bacilles de la Tuberculine » en contact avec de l'acétone (1,5 l. d'acétone pour 1 Kg. de bacilles) pendant trois jours à la température du laboratoire. Malgré des agitations fréquentes, le contact entre la masse collante des bacilles et le sol-

vant n'est pas bon. La solution acétonique se colore cependant très fortement en brun rouge. On la sépare par une filtration très rapide à travers une étoffe. On met une nouvelle quantité d'acétone (1,5 l. par Kg.), puis après 3 ou 4 jours de contact on sépare la solution acétonique également très colorée.

On réunit les extraits acétoniques, puis, après les avoir soigneusement filtrés, on les évapore à sec. On obtient un résidu sirupeux (constitué surtout par du glycérol) surmonté d'un gâteau de graisses très fortement colorées en brun rouge.

b) Extraction par l'acétone chaude

La masse bacillaire extraite deux fois par de l'acétone froide est toujours collante, car elle renferme encore une grande quantité de glycérol.

On la place dans la cartouche d'un appareil à extraction continue (appareil genre Soxhlet) où elle est soumise à une extraction par de l'acétone chaude. Le solvant pénètre très difficilement dans la masse pâteuse et compacte des bacilles ; après chaque journée de fonctionnement de l'appareil, on est obligé de retirer les bacilles de la cartouche, de les diviser, puis de les replacer, en ayant soin de mettre dans le fond de la cartouche la portion qui se trouvait en surface et vice-versa. Ces manœuvres sont fastidieuses et pénibles, mais elles sont absolument indispensables si l'on veut réaliser une extraction complète dans des appareils de cette taille (capacité de la cartouche : 1 litre). On prolonge l'extraction jusqu'à ce que la masse bacillaire soit devenue parfaitement pulvérulente (c'est-à-dire qu'elle ne renferme pratiquement plus de glycérol provenant du milieu de culture). On obtient ce résultat après 50 heures de fonctionnement de l'appareil.

L'extrait acétonique contient une quantité considérable de glycérol qui se rassemble en une phase distincte au fond du ballon d'extraction.

La solution acétonique colorée en brun rouge laisse déposer par refroidissement un abondant précipité de « cires » blanches insolubles dans l'acétone à 15°.

On sépare les « cires », puis on évapore à sec les phases liquides. On obtient un énorme résidu sirupeux de glycérol surmonté d'un gâteau de « graisses acétono-solubles » très fortement colorées en brun rouge.

Dans le tableau suivant, nous indiquons les quantités respectives et l'activité hapténique des diverses fractions grossièrement séparées à partir des extraits acétonique. (Nous donnons à titre comparatif l'activité de la fraction extraite ultérieurement des mêmes bacilles par l'alcool).

EXTRACTION ACETONIQUE		Quantités rapportées à 1 Kg. de B. Tuber.	Activité hapténique H
Extrait acétonique à froid	« Graisses acétono-solubles »	15 g.	1/2
	Résidu sirupeux (glycérol)	100 cm ³	néant
Extrait acétonique à chaud	« Graisses acétono-solubles »	7,5 g.	1/7
	« Cires » (insolubles à 15°)	25 g.	1/1
	Résidu sirupeux (glycérol)	400 cm ³	néant
Extrait alcoolique : fraction hapténique		10 g.	1/600

On voit donc que l'extraction fractionnée par l'acétone froide, puis tiède, permet d'éliminer une quantité considérable de substances (« graisses acétono-solubles », « cires » et glycérol) qui, sans ce traitement préalable, seraient venues encombrer l'extrait alcoolique.

Les traces d'activité hapténique décelées dans les lipides extraits par l'acétone sont négligeables vis-à-vis de la grosse quantité d'haptène lipodique extrait du résidu bacillaire par l'alcool.

II. Extraction alcoolique

Avant de soumettre les corps bacillaires à l'action de l'alcool, on chasse l'acétone qui les imbibe. On effectue cette opération sous le vide, afin d'éviter une nouvelle oxydation. (L'oxydation de cette masse pulvérulente au contact de l'air serait beaucoup plus importante maintenant, que celle subie par les

bacilles enrobés de glycérol lors de la concentration du milieu de culture).

On pulvérise soigneusement le résidu bacillaire dans un mortier, puis on le laisse s'imbiber à l'alcool à 96 c. pendant une à deux heures.

Les corps bacillaires sont alors soumis à une extraction continue par de l'alcool à 96 c. bouillant pendant 60 heures (en 6 journées) dans un appareil de Kumagawa (après les 2^{me} et 4^{me} journées de fonctionnement on retire les bacilles de la cartouche de l'appareil pour exécuter les mêmes manœuvres de malaxage que celles effectuées lors de l'extraction acétonique).

Après refroidissement à la température du laboratoire, l'extract alcoolique se compose d'une solution colorée en brun rouge et d'une importante fraction solide brune très dure qui adhère fortement aux parois du ballon d'extraction.

On sépare les fractions solubles et insolubles dans l'alcool froid, puis on titre leur pouvoir hapténique (les poids sont rapportés à 1 Kg. de « Bacilles de la Tuberculine »).

fraction [1] ⁽⁷⁾ soluble dans l'alcool froid : 25 g. H : 1/80 à 1/100
fraction [2] insoluble " " : 40 g. H : 1/100 à 1/150

Nous avons constaté avec surprise que la majeure partie de l'haptène se concentrait dans la fraction insoluble dans l'alcool froid. (Nous verrons plus loin l'interprétation que l'on peut donner de ce fait inattendu).

Nous avons alors cherché à séparer les phosphatides hapténiques contenus dans les deux fractions de l'extract alcoolique. Nous avons tout d'abord essayé de les extraire à l'aide d'éther, puis de chloroforme. Malgré des extractions prolongées avec ces solvants bouillants, toutes ces tentatives ont échoué : nous n'avons pu dissoudre que des quantités infimes d'haptène. L'extract alcoolique renferme une quantité considérable de substances non lipidiques ⁽⁸⁾ totalement insolubles dans l'éther et le chloroforme. Par leur seule présence, elles inhibent complètement l'extraction de l'haptène par ces solvants.

(7) Pour la commodité de l'exposé, nous avons numéroté d'une manière arbitraire les diverses fractions obtenues et nous les avons inscrites en caractères gras entre crochets : ex. [75], afin de les distinguer des numéros des références bibliographiques inscrites en caractères normaux entre parenthèses : ex. (75).

(8) Ces substances non lipidiques proviennent en grande partie du milieu de culture concentré qui enrobait les « Bacilles de la Tuberculine ». Elles possèdent une odeur comparable à celle des peptones commerciales.

Grâce à l'action combinée de l'eau, de l'éther, de l'acétone et du chlorure de sodium (voir ci-dessus page 90), nous avons pu séparer en totalité des lipides d'avec l'énorme masse des substances non lipidiques contenues dans l'extrait alcoolique sans perdre la moindre trace d'haptène.

III. — Élimination des substances non lipidiques contenues dans l'extrait alcoolique.

Traitement par l'eau, l'éther, l'acétone et le chlorure de sodium.

Nous avons traité séparément les fractions [1] soluble dans l'alcool froid et [2] insoluble dans l'alcool froid.

a) Fraction [1] soluble dans l'alcool froid

On évapore à sec les solutions alcooliques et on reprend le résidu d'évaporation par un litre d'eau bouillante. On obtient ainsi une émulsion sirupeuse et trouble que l'on agite avec 1,5 l. d'éther ; il se forme une importante émulsion. Après 24 heures de contact, on ajoute 0,5 l. de solution de chlorure de sodium à 18 p. 100 (l'émulsion n'est que partiellement brisée), puis 1,5 l. d'acétone. Après une agitation vigoureuse, on voit se séparer très rapidement deux phases limpides et très fortement colorées en brun rouge : une phase hydroacétonique sirupeuse, chargée de substances non lipidiques et une phase éthéro-acétonique contenant des lipides. A la surface de séparation des deux phases liquides se rassemble un important précipité légèrement coloré en brun ; c'est le « précipité intermédiaire ». On recueille séparément les deux phases liquides et le « précipité intermédiaire » (Voir Tableau III, page 101).

« **Précipité intermédiaire** ». — On purifie trois fois le précipité intermédiaire en lui faisant subir le même traitement que le résidu d'évaporation des solutions alcooliques, mais on emploie des quantités moindres de solvants (eau 120 cm³, éther 180 cm³, solution de ClNa 50 cm³ et acétone 180 cm³, pour chaque purification). Les dernières phases hydro-acétoniques et éthéro-acétoniques sont à peine teintées de jaune et ne renferment que des quantités infimes de matières organiques. On déshydrate ensuite le « précipité intermédiaire » en le traitant par de l'acétone. II

constitue la fraction [3] qui pèse 27 g. et possède une activité hapténique très élevée $H = 1/1.000$ à $1/1.500$.

Phases éthéro-acétoniques. — On rassemble toutes les phases éthéro-acétoniques, puis on les lave trois fois avec une solution hydro-acétoniques de chlorure de sodium (eau : 2 volumes, acétone : 1 volume, ClNa 6 p. 100).

On concentre les solutions éthérées, puis on en précipite les phosphatides par un excès d'acétone. On purifie ces phosphatides en les précipitant trois fois au moyen d'acétone à partir de leur solution éthérée. On obtient 6,36 g. de phosphatides (fraction [4]) qui possèdent une activité hapténique élevée : $H = 1/500$ à $1/800$.

Les solutions acétoniques mères des phosphatides (fraction [5]) renferment 9,6 gr. de « graisses acétono-solubles » qui ne possèdent qu'une infime quantité d'haptène ($H = 1/10$).

Phases hydro-acétoniques : fraction [6]. — Elles renferment une quantité considérable de substances non lipidiques : 21 gr. totalement dépourvues d'activité hapténique (substances diverses provenant du milieu de culture).

b) Fraction [2] insoluble dans l'alcool froid

On traite cette fraction comme la précédente, mais avec des quantités plus importantes de solvants.

Ici la totalité de l'haptène est concentrée dans le « *précipité intermédiaire* » qui après trois purification pèse 95 g. et possède une activité hapténique importante ($H = 1/500$ à $1/800$) (fraction [7]).

Les phases éthéro-acétoniques lavées (fraction [8]) renferment 24 g. de substances cireuses n'ayant entraîné que des traces négligeables d'haptène (c'est pourquoi nous n'avons pas tenté leur fractionnement).

Enfin *les phases hydroacétoniques* (fraction [9]) contiennent une énorme quantité de substances non lipidiques (360 g.) totalement inactives du point de vue hapténique.

Nous avons schématisé toutes ces opérations dans le tableau III (page 101) où les chiffres sont rapportés à 1 Kg de « Bacilles de la Tuberculine ».

En résumé, l'haptène lipoidique est réparti dans trois fractions. La plus importante est le « *précipité intermédiaire* » [7] : elle est soluble dans l'alcool froid. Les deux autres fractions au contraire : « *précipité intermédiaire* » [3] et « *phosphatides* » [4] sont solubles dans l'alcool froid. On voit donc que l'haptène lipoidique contenu dans l'extrait alcoolique est entraîné d'une part, dans la solution, par les lipides solubles dans l'alcool froid, et d'autre part, dans le précipité par les lipides solubles dans l'alcool bouillant, mais insolubles à froid.

Au début de ce travail nous extrayions les « Bacilles de la Tuberculine » directement par de l'alcool. La solution alcoolique froide contenait les « graisses acétono-solubles ». L'haptène lipoidique se trouvait alors, en presque totalité dans cette solution froide. Ici, au contraire, nous avons enlevé aux « Bacilles de la Tuberculine » par une extraction acétonique préalable, une grande quantité de substances et, en particulier, les « graisses acétono-solubles » ; l'extrait alcoolique du résidu bacillaire est alors relativement pauvre en lipides solubles à froid ; c'est pourquoi la plus grande partie de l'haptène précipite par refroidissement.

Nous verrons dans la suite de ce travail que, quelle que soit la solubilité primitive dans l'alcool des fractions étudiées, on en sépare finalement des préparations hapténiques actives purifiées qui possèdent toutes des propriétés identiques, des activités sérologiques égales et des compositions chimiques semblables.

IV. — Purification par l'éther.

Nous avons vu comment la présence d'énormes quantités de substances non lipidiques dans l'extrait alcoolique rendait pratiquement impossible l'extraction de l'haptène lipoidique directement par l'éther. Mais grâce à la purification précédente, nous avons éliminé toutes ces substances si gênantes et l'éther peut dissoudre aisément l'haptène que nous avons rassemblé dans les « *précipités intermédiaires* ».

1° « Précipité intermédiaire » [1] de la fraction soluble dans l'alcool froid

On traite le « *précipité intermédiaire* » [3] par dix fois son volume d'éther bouillant. La presque totalité de la fraction se

dissout. On refroidit la solution à $+ 4^{\circ}$, puis on sépare la solution éthérée d'avec le précipité. On extrait cinq fois le précipité par de petites quantités d'éther à 15° . On rassemble les solutions éthérées et, après les avoir évaporées à sec, on les traite une dernière fois de la même manière (mais avec des volumes moindres de solvant). On élimine ainsi une nouvelle petite quantité de substances insolubles dans l'éther.

On sépare ainsi à partir du « précipité intermédiaire » deux fractions :

- (Le « précipité intermédiaire » [3] possédait une activité $H = 1/1000$ à $1/1500$)
- { fraction [10] soluble dans l'éther, poids 89 p. 100. $H = 1/1500$
 - { fraction [11] insoluble dans l'éther, poids 11 p. 100. $H = 1/100$

Cette purification permet donc d'éliminer 11 p. 100 de substances 15 fois moins actives que la fraction soluble dans l'éther.

2° « Précipité intermédiaire » [7] de la fraction insoluble dans l'alcool froid

On traite ce « précipité intermédiaire » [7] comme le précédent et l'on obtient :

- (Le « précipité intermédiaire » [7] possédait une activité $H = 1/500$ à $1/800$)
- { fraction [12] soluble dans l'éther, poids 57 p. 100. $H = 1/900$ à $1/1000$
 - { fraction [13] insoluble dans l'éther, poids 43 p. 100. $H = 1/100$

On élimine donc une quantité considérable de substances 8 à 10 fois moins actives que la solution éthérée, qui, elle-même, est beaucoup plus active que le « précipité intermédiaire » dont on l'a séparée.

V. — Purification par l'acétone bouillante.

Élimination des substances cireuses.

Avant d'extraire l'haptène lipoidique par de l'alcool, les 12 Kg de « Bacilles de la Tuberculine » ont subi une extraction prolongée par de l'acétone chaude ; cependant ce traitement n'a pas éliminé la totalité des substances cireuses. L'alcool bouillant extrait encore au résidu bacillaire, une nouvelle quantité de « cires » qui précipitent par refroidissement de la solution alcoolique.

Lorsque l'on purifie la fraction de l'extrait alcoolique qui est insoluble à froid dans l'alcool, en la traitant par de l'eau, de

l'éther, de l'acétone et du chlorure de sodium, une grande partie des « cires » passe dans la phase éthéro-acétonique, où elles n'entraînent que des traces négligeables d'haptène ; mais le reste des « cires » accompagne l'haptène lipoidique contenu dans le « précipité intermédiaire ».

Enfin lorsque l'on traite le « précipité intermédiaire » par de l'éther, l'haptène et les « cires » se dissolvent ensemble.

Les substances cireuses du Bacille tuberculeux sont en majeure partie solubles dans l'acétone chaude. Nous avons donc soumis la fraction [12] soluble dans l'éther à une extraction par l'acétone bouillante pour en éliminer le maximum de « cires ». On emploie une technique analogue à celle décrite page 119 et l'on obtient :

(La fraction [12] soluble dans l'éther possédait une activité $H = 1/900$ à $1/1000$)
{ fraction [14] insoluble dans l'acétone bouillante : 92 p. 100. $H = 1/1000$ à $1/1200$
{ fraction [15] soluble dans l'acétone bouillante : 8 p. 100. $H = 1/20$

On élimine donc par ce traitement 8 p. 100 de substances pratiquement dépourvues d'haptène lipoidique.

On traite de même par de l'acétone bouillante la fraction [10] soluble dans l'éther provenant du « précipité intermédiaire » de la fraction soluble dans l'alcool froid.

(La fraction [10] soluble dans l'éther possédait une activité $H = 1/1500$)
{ fraction [16] insoluble dans l'acétone bouillante : 98,2 p. 100. $H = 1/1500$
{ fraction [17] soluble dans l'acétone bouillante : 1,8 p. 100. $H = 1/50$

Malgré l'insolubilité des substances cireuses dans l'alcool froid, on voit que les lipides contenus dans la solution alcoolique [1] en avaient entraîné une petite quantité par solvation.

En somme, nous obtenons deux fractions très actives [14] et [16] ; l'une provient de la partie insoluble dans l'alcool froid, l'autre de la partie soluble, mais ces deux fractions après les purifications qui ont permis de les obtenir, constituent un ensemble en dehors duquel il n'existe pratiquement pas d'activité hapténique. C'est sur ces fractions que va porter la suite de notre étude.

Tableau III

Extraction de l'haptène lyphoïdique
contenu dans les "Bacilles de la Tuberculine"

1 Hg de "Bacilles de la Tuberculine"
extrait 2 fois avec 1,5 l x 2 d'acétone à 15°

Masse collante de corps bacillaires
extraite 50 h par de l'acétone chaude (appareil genre Doochlet)

Résidu bacillaire pulvérulent
extrait 60 h par de l'alcool à 96° bouillant (appareil de Kimmagawa)

Extrait alcoolique
(2 l d'alcool)

Insoluble à 15°

(2)

40 g
H = 1/100 à 1/150

traité par eau, éther, acétone, Cl Na

Phase
eau, acétone, Cl Na

(9)

30 g

"Substances non lyphoïdiques"

H: néant

Phase
éther, acétone

(8)

2 g

"Cres"

H trace

"Précipité intermédiaire"

(7)

7,9 g

H = 1/500 à 1/800

traité par l'éther

Soluble dans l'éther

(12)

4,5 g

H = 1/900 à 1/1000

traité par l'acétone bouillante

Insoluble dans l'acétone bouillante

(14)

4,14 g

H = 1/1000 à 1/1200

Soluble à 15°

(1)

25 g

H = 1/80 à 1/100

traité par eau, éther, acétone, Cl Na

Phase
eau, acétone, Cl Na

(6)

21 g

Substances non lyphoïdiques

H: néant

Phase éther acétone
dissoute dans éther + acétone

Précipité

(4)

0,53 g

H: 1/500 à 1/600

Dissolution

(5)

0,8 g

H: 1/10 (négligeable)

"Précipité intermédiaire"

(3)

2,25 g

H = 1/1000 à 1/1500

traité par l'éther

Soluble dans l'éther

(10)

2 g

H = 1/1500

traité par l'acétone bouillante

Insoluble dans l'acétone bouillante

(16)

1,96 g

H = 1/1500

RESUME ET CONCLUSIONS DU CHAPITRE I

Les Bacilles tuberculeux qui constituent notre matière première sont un mélange de souches bovines et humaines cultivées sur bouillon peptoné riche en glycérol. Ces bacilles sont chauffés en présence de leur milieu de culture d'abord dans un autoclave pendant 1 h. à 120°, puis au contact de l'air sur bain de vapeur jusqu'à réduction du volume au 1/10^m. Les corps bacillaires recueillis par filtration constituent notre matière première. Ils sont enrobés par une partie du milieu de culture concentré et ils forment une masse collante, riche en glycérol, que nous désignons par le terme : « Bacilles de la Tuberculine ».

Malgré une dénaturation profonde des protéides par la chaleur et une oxydation partielle des lipides au contact de l'air, l'haptène lipoïdique n'est pas détruit.

Dans les bacilles vivants, l'haptène lipoïdique n'est pas libre, mais probablement à l'état de cénapse lipidoprotéidique. Sous l'action prolongée de la chaleur, ce cénapse est décomposé dans les « Bacilles de la Tuberculine » et l'haptène est libéré.

L'haptène lipoïdique est très soluble dans l'eau. Lorsque l'on met des « Bacilles de la Tuberculine » au contact de l'eau, l'haptène lipoïdique y diffuse rapidement. Dans l'extrait aqueux, il accompagne des phosphatides comme dans l'extrait alcoolique des corps bacillaires.

Il est donc impossible de séparer par un lavage même rapide avec de l'eau, les corps bacillaires d'avec le milieu de culture qui les enrobe, sans en extraire une partie de l'haptène lipoïdique.

L'haptène lipoïdique est insoluble dans l'acétone bouillante. Afin de déshydrater les « Bacilles de la Tuberculine » et d'en

éliminer le maximum de « graisses acétono-solubles », de « cires » et de glycérol, sans dissoudre l'haptène lipoidique, on soumet les bacilles à une extraction progressive par l'acétone froide, puis chaude.

L'haptène lipoidique reste dans le résidu bacillaire d'où on l'extrait par de l'alcool bouillant. Par refroidissement, la solution alcoolique laisse déposer un abondant précipité. Dans l'alcool ne restent dissoutes que de petites quantités de lipides et seulement une partie de l'haptène lipoidique ; la plus grande partie de l'haptène accompagne les lipides qui précipitent par refroidissement.

L'extraction par l'éther de l'extrait alcoolique émulsionné dans de l'eau permet, grâce à l'addition d'acétone et de chlorure de sodium, de séparer quantitativement l'haptène lipoidique d'avec les substances non lipidiques. Le mélange est effectué dans l'ordre suivant : émulsion aqueuse de l'extrait alcoolique (2 volumes), éther (5 volumes), puis solution de chlorure de sodium à 18 p. 100 (1 volume) et enfin acétone (3 volumes). Il se forme deux phases liquides limpides et à leur surface de séparation un abondant précipité. La presque totalité de l'haptène lipoidique se concentre dans ce « précipité intermédiaire ». La phase éthéro-acétonique n'en renferme qu'une petite quantité. Les abondantes substances non lipidiques contenues dans la phase hydroacétonique salée n'en entraînent pas trace.

L'haptène lipoidique est extrait, à partir du « précipité intermédiaire », à l'aide d'éther qui laisse insoluble une importante fraction inactive.

Enfin, une extraction par de l'acétone bouillante permet d'éliminer une petite quantité de substances cireuses solubles dans ce solvant chaud.

Cette méthode permet d'obtenir à partir de 1 kg de « Bacilles de la Tuberculine » l'haptène lipoidique sous la forme d'une préparation lipidique pesant 6 g. et dont l'activité sérologique est considérable ($H = 1/1.200$) (0,25 cm³ d'une solution contenant par cm³ $\frac{1 \text{ mg}}{1.200}$ fixe encore complètement 2,5 doses minima d'alexine en présence de sérum antituberculeux).

Cette préparation donne avec l'eau une solution visqueuse. Elle est soluble dans l'éther et insoluble dans l'acétone bouillante. Sa solubilité dans l'alcool est fonction des lipides qui accompagnent l'haptène lui-même.

Nouvelle Méthode d'Extraction de l'Haptène Lipéidique contenu dans les « Bacilles de la Tuberculine »

Le travail que nous exposons dans les chapitres suivants est loin d'être terminé : il demandera probablement encore de longues recherches qui exigeront l'extraction de grande quantité d'haptène lipéidique. C'est pourquoi, nous nous sommes attachée à perfectionner notre méthode d'extraction que nous avons déjà modifiée progressivement. Aujourd'hui, connaissant mieux les propriétés de l'haptène, et nous basant sur les faits acquis au cours des extractions successives, nous avons mis au point une technique pratique permettant d'extraire commodément et avec un excellent rendement l'haptène lipéidique contenu dans de grosses masses de « Bacilles de la Tuberculine ». Cette méthode présente, en outre, l'avantage de concentrer l'haptène dans une unique fraction. Nous décrirons brièvement cette méthode qui nous a permis d'extraire, à partir de 18 kgs de « Bacilles de la Tuberculine », une importante quantité de substances hapténiques qui nous serviront à poursuivre nos recherches.

Principe. — Il n'est pas possible de laver les « Bacilles de la Tuberculine » avec de l'eau sans perdre une quantité importante d'haptène lipéidique ; mais, grâce à l'emploi d'eau contenant un tiers d'acétone et 6 p. 100 de chlorure de sodium, nous avons réussi à éliminer la majeure partie du milieu de culture concentré qui enrobe les Bacilles, sans leur enlever d'haptène lipéidique.

Les Bacilles lavés par l'eau acétonique salée forment alors une masse pulvérulente qu'il est très aisé de déshydrater et d'extraire par de l'acétone. Grâce à un traitement progressif par l'acétone froide d'abord, puis tiède et finalement bouillante, on enlève aux Bacilles la presque totalité des « graisses acétonosolubles » et des « cires » qu'ils contiennent sans entraîner d'haptène lipéidique en solution.

La totalité de l'haptène demeure dans les corps bacillaires d'où on l'extraît par de l'alcool bouillant. La solution alcoolique ne renfermant plus qu'une petite quantité de substances solubles à froid, la totalité de l'haptène se concentre dans le précipité qui apparaît par refroidissement de la solution alcoolique.

Lorsque l'on purifie cette fraction insoluble dans l'alcool à 15°, au moyen d'eau, d'éther, d'acétone et de chlorure de sodium (selon la technique décrite page 90) on retrouve la totalité de l'haptène dans le « précipité intermédiaire ».

On obtient ainsi, à partir de 1 kg. de « Bacilles de la Tuberculine », 10 g. d'une préparation lipidique possédant une activité hapténique élevée $H=1/500-1/800$.

Technique. — (Les opérations décrites ci-dessous sont schématisées dans le tableau III bis, page 106, elles sont rapportées à 1 kg. de « Bacilles de la Tuberculine ».

On agite 1 kg. de « Bacilles de la Tuberculine » avec 2 litres du mélange suivant : eau : 1 volume, solution de ClNa à 18 p. 100 : 1 volume, acétone : 1 volume. Après 24 heures de contact, on décante par siphonage, le liquide surnageant les corps bacillaires. On lave une deuxième fois, avec 2 litres du même solvant, les corps bacillaires que l'on sépare par essorage sur un grand entonnoir de Buchner, ou par filtration sur une étoffe suivie d'une compression dans une presse à main.

On traite les corps bacillaires par 1,5 litre d'acétone, à la température du laboratoire, comme ils se déposent rapidement, on les agite de temps en temps. Après 3 ou 4 jours de contact, on décante l'acétone par siphonage, puis on filtre très grossièrement les bacilles (on fixe une triple épaisseur de gaze autour du goulot du récipient qui contient les bacilles, puis on le retourne et on laisse égoutter l'acétone). On répète ce traitement trois fois encore en employant chaque fois 1,5 litre d'acétone.

On place les corps bacillaires dans la cartouche d'un appareil de Soxhlet où ils sont soumis à une extraction continue par de l'acétone tiède pendant 18 heures. Ils sont ensuite extraits par de l'acétone bouillante pendant 18 heures dans un appareil de Kumagawa.

On chasse, sous le vide, l'acétone qui imprègne le résidu bacillaire. On pulvérise soigneusement ce résidu, puis on le laisse s'imbiber d'alcool absolu pendant quelques heures. On place cette pâte microbienne dans la cartouche d'un appareil de Soxhlet où elle est extraite par de l'alcool absolu tiède pendant 18 heures. On adapte alors le ballon d'extraction de l'appareil de Soxhlet à un appareil genre Kumagawa où l'on poursuit l'extraction des bacilles pendant 18 heures avec le même alcool absolu, mais à la température de l'ébullition.

Après chaque journée (9 h.) de fonctionnement des appareils, on retire les bacilles des cartouches, puis, après les avoir soigneusement divisés, on place la portion qui se trouvait sur le dessus de la cartouche au fond et vice versa. Les appareils à extraction continue sont munis d'un dispositif soupape contenant du chlorure de calcium anhydre afin d'éviter l'hydratation des solvants au cours du fonctionnement.

Après refroidissement à la température ordinaire, on filtre la solution alcoolique (1,5 l.). La fraction insoluble dans l'alcool après refroidissement (c'est elle qui nous intéresse) adhère en grande partie au fond du ballon d'extraction. On la traite directement par 200 cm³ d'eau bouillante. Après quelques heures, on obtient une émulsion vis-

Tableau III bis Extraction de l'haptène lipoidique contenu dans les "Bacilles de la Tuberculine"

1 Kg de "Bacilles de la Tuberculine"

lavés 2 fois avec $\left\{ \begin{array}{l} \text{eau} = 2 \text{ vol} \\ \text{acétone} = 1 \text{ vol} \\ \text{CLNa} = 6 \text{ p. 100} \end{array} \right.$

2 l. + 2 l. du mélange

↓

Corps bacillaires lavés
extraits 4 fois par 1,5 l. x 4 d'acétone

↓

Corps bacillaires déshydratés et partiellement délipidés
extraits 18h par de l'acétone tiède (appareil de Döcklet)
puis 18h par de l'acétone bouillante (appareil de Humagawa)

↓

Extrait Alcoolique
(1.5 l. d'alcool)

Indissoluble à 15°

traité 3 fois par $\left\{ \begin{array}{l} \text{eau} = 2 \text{ vol.} \\ \text{éthér} = 3 \text{ vol.} \\ \text{acétone} = 3 \text{ vol.} \end{array} \right.$

$\left\{ \begin{array}{l} \text{Sol. de CLNa} \\ \text{à 18 p. 100: 1 vol.} \end{array} \right.$

Soluble à 15°

$H = \frac{1,5 \text{ g}}{150 - 1/200}$

Phase
eau, acétone, CLNa
H = néant

Phase
éthér acétone
 $H = \frac{0,6 \text{ g}}{1/25}$
(négligeable)

↓

"Précipité intermédiaire"

$H = \frac{10 \text{ g}}{500 - 1/800}$

queuse et trouble que l'on place dans une ampoule à décantation. On l'agite avec 300 cm³ d'éther ; après 12 heures de contact on ajoute 100 cm³ d'une solution de chlorure de sodium à 18 p. 1000 et 300 cm³ d'acétone. On recueille le « précipité intermédiaire » qui se rassemble rapidement entre les phases aqueuses éthérées. On purifie ce « précipité intermédiaire », deux fois encore, par la même méthode en employant les quantités suivantes de réactifs : eau : 100 cm³, éther : 150 cm³, solution de ClNa à 18 p. 100 : 50 cm³, acétone : 150 cm³. On déshydrate ce « précipité intermédiaire » purifié, 3 ou 4 fois, en le traitant par de l'acétone. On obtient 10 g. d'une préparation blanche et dure qui possède une activité hapténique élevée : $H=1/500-1/800$

CHAPITRE II

FRACTIONNEMENT DE LA FRACTION LIPOÏDIQUE HAPTENIQUE SOLUBLE DANS L'ÉTHÉR ET INSOLUBLE DANS L'ACETONE BOUILLANTE

PLAN DU CHAPITRE II

1. — **ESSAI D'ISOLEMENT DE L'HAPTENE LIPOÏDIQUE.....**
 - Séparation des fractions les plus actives.....
 - FRACTIONNEMENT** par le chloroforme et l'alcool méthylique.
par l'alcool méthylique.....
 - Modification de la composition chimique au cours de ces
fractionnements
 - Fractionnement par l'alcool à 50 c. et le chlorure de sodium..
 - Purification par l'alcool à 50 c. et le chlorure de sodium..
 - Fractionnement par la pyridine.....
 - Fractionnement par l'acide acétique glacial et l'acétone..
 - Propriétés et compositions des fractions les plus actives..**
 - Propriétés physiques.....
 - Propriétés de l'haptène contenu dans ces fractions....
 - Composition chimique des fractions les plus actives..
 - Essais infructueux de fractionnement des préparations les
plus actives**
 - Essais de libération de l'acide phosphatidique.....
 - Essais d'élimination des glucides par l'acide sulfurique
dilué et l'éther
 - Essais de fractionnement par le chlorure de cadmium..
 - Essais de fractionnement par précipitation fractionnée
de la solution aqueuse par de l'alcool
 - Conclusions**
 2. — **SEPARATION ET ETUDE DES FRACTIONS INACTIVES
PLUS SOLUBLES DANS L'ALCOOL QUE LES FRACTIONS
LES PLUS ACTIVES**
 - Obtention
 - Propriétés
 - Constitution : séparation des acides phosphatidiques d'avec
les lipides azotés.....
 3. — **SEPARATION DES FRACTIONS PEU ACTIVES MOINS
SOLUBLES DANS L'ALCOOL QUE LES FRACTIONS LES
PLUS ACTIVES**
 - Obtention
 - Propriétés
- RESUME ET CONCLUSIONS DU CHAPITRE II**

La méthode décrite dans le chapitre précédent permet d'obtenir, avec un bon rendement, l'haptène lipoïdique sous la forme d'une fraction lipidique soluble dans l'éther et insoluble dans l'acétone bouillante, mais cette préparation n'est pas un corps pur ; c'est au contraire un mélange très complexe de lipides possédant des propriétés très voisines. Par suite de phénomènes de solvatations particulièrement importants, la séparation des constituants de ce mélange est une opération très difficile et très longue, elle ne se fait que d'une manière incomplète et avec de mauvais rendements.

1. ESSAI D'ISOLEMENT DE L'HAPTENE LIPOIDIQUE

SEPARATION DES FRACTIONS LES PLUS ACTIVES

Le but du travail est d'étudier l'haptène lipoïdique. Afin d'essayer de le séparer d'avec les lipides non hapténiques qui l'accompagnent dans notre préparation, nous avons pris comme fil directeur de nos fractionnements l'activité sérologique.

Avant de mettre en œuvre une technique de fractionnement quelconque, nous avons tout d'abord contrôlé que ce procédé n'altérerait nullement l'haptène lipoïdique. Nous avons ensuite déterminé l'activité sérologique de chacune des fractions obtenues. Rassemblant alors les parties les plus actives, nous les avons soumises à un nouveau fractionnement. Nous avons ainsi poursuivi ces opérations de proche en proche. A chaque étape, on voit croître l'activité hapténique des fractions obtenues ; mais aussi, on voit augmenter les difficultés qui se présentent pour faire un nouveau fractionnement.

La séparation de lipides voisins quels qu'ils soient, est toujours une opération difficile. Mais ici, nous avons été également gênée par la grande fragilité de l'haptène lipoïdique qui est détruit par tous les réactifs acides ou alcalins. L'emploi de réactifs strictement neutres limite considérablement le choix des techniques de fractionnements et les rend beaucoup moins efficaces.

Nous avons également suivi l'évolution de la composition chimique des fractions obtenues au cours de ces opérations. La préparation initiale (soluble dans l'éther, insoluble dans l'acétone bouillante) contient des phosphatides ; nous avons donc effectué des dosages de phosphores et d'azote, afin de savoir si l'activité hapténique est liée à la présence de ces éléments. La préparation initiale renferme également des oses, à l'état d'osides non réducteurs. On connaît le grand rôle que jouent les glucides en immunochimie et spécialement dans la constitution des haptènes. Nous avons donc déterminé la quantité de glucides contenus dans les diverses fractions afin de savoir si l'on doit attribuer l'activité sérologique à leur présence.

Fractionnement par le chloroforme et l'alcool méthylique

Nous avons tout d'abord utilisé une méthode employée fréquemment pour fractionner les phosphatides ; elle consiste en une précipitation de la solution chloroformique concentrée des lipides phosphorés par l'alcool méthylique. Cette méthode, nous l'avons vu, avait déjà été employée avec succès par Machebœuf et Bonnefoi (105) pour purifier le même haptène lipoïdique ⁽¹⁾.

On fait une solution à 10 p. 100 dans le chloroforme de la fraction [14] (tableau III, page (101) (préparation hapténique soluble dans l'éther et insoluble dans l'acétone bouillante provenant de la fraction insoluble à froid de l'extrait alcoolique.

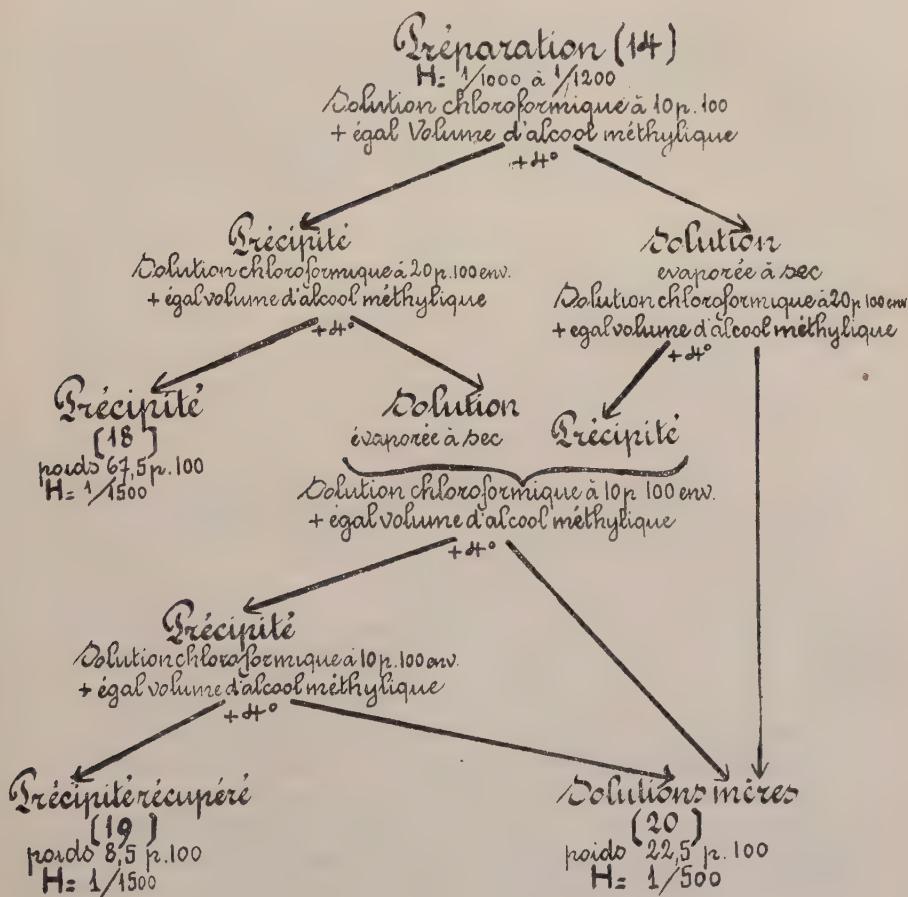
On élimine une toute petite quantité de substances insolubles et inactives. On chauffe la solution dans un bain-marie, puis on ajoute par petites quantités un égal volume d'alcool méthylique chaud ; la solution reste limpide, mais un précipité se forme dans ce milieu homogène par refroidissement. Après une nuit à la glacière (+ 4°), on sépare, sur un filtre refroidi, le précipité que l'on purifie encore par un deuxième traitement semblable. Afin d'augmenter le rendement de ce fractionnement, on récupère à partir des deux solutions mères chloroformo-méthyliques un deuxième précipité que l'on purifie également par une nouvelle précipitation. Les détails de ces opérations sont donnés par le tableau IV (page 113). On a donc séparé de la fraction initiale, 22,5 p. 100 de lipides solubles dans le mélange de chloroforme et d'alcool méthylique à + 4° : fraction [20] ; cette fraction est trois fois moins active ($H = 1/500$) que les deux autres fractions insolubles dans ce mélange de solvants froids : [18] (précipité) et [19] (précipité récupéré) qui possèdent une activité hapténique $H = 1/1.500$.

On applique ce même traitement à la préparation [16] (tableau III, page 101) (lipides solubles dans l'éther et insolubles dans l'acétone bouillante provenant de la fraction soluble à froid de l'extrait alcoolique). Mais, comme cette préparation est très

(1) Nous avons traité séparément les deux préparations initiales (solubles dans l'éther et insolubles dans l'acétone bouillante) qui proviennent l'une de la fraction soluble à froid, l'autre de la fraction insoluble à froid de l'extrait alcoolique. La nature, et surtout la proportion relative des lipides qui accompagnent l'haptène lipoïdique dans ces deux préparations ne sont pas les mêmes. C'est pourquoi il est plus aisé de fractionner tout d'abord, séparément, ces deux préparations initiales.

Tableau IV

Fractionnement par le Chloroforme et l'alcool méthylique



riche en lipides, très solubles dans l'alcool froid, on utilise des volumes moindres de solvants et on opère à plus basse température. On obtient les résultats suivants :

Préparation initiale [16]	H : 1/1.500
{ Précipité [20] : 20 p. 100	H : 1/2.000-1/3.000
{ Précipité récupéré [21] : 24 p. 100 ..	H : 1/2.000-1/3.000
{ Solutions mères [22] : 65 p. 100	H : 1/500

Les solutions mères contiennent ici une quantité considérable de lipides qui sont beaucoup moins actifs (4 à 6 fois) que les fractions précipitées.

Cette méthode permet donc de séparer rapidement une partie importante des lipides les plus solubles dans l'alcool méthylique contenus dans le mélange initial des phosphatides. Grâce à la récupération effectuée dans les solutions mères, on réalise cette séparation sans perdre une trop grosse quantité d'haptène dans les fractions peu actives. Mais, pratiquement, cette méthode ne permet pas une purification plus poussée des précipités actifs, car les solutions mères chloroformo-méthyliques entraînent alors une trop grosse quantité d'haptène ⁽²⁾.

Il faut donc faire appel pour poursuivre la purification, à une nouvelle technique de fractionnement.

Purification par dissolution dans l'alcool méthylique chaud et précipitation fractionnée de la solution méthylique

L'extraction de l'haptène lipoidique par l'alcool méthylique bouillant, suivie d'une précipitation fractionnée par refroidissement et concentration successive de la solution obtenue, nous a donné des résultats intéressants ⁽³⁾.

Technique. — On extrait les précipités actifs précédents (fractions [18] et [19] rassemblées) une vingtaine de fois avec des petits volumes d'alcool méthylique bouillant. Ils forment une masse pâteuse qui abandonne une quantité importante de lipides aux premières portions d'alcool méthylique employées ; puis les nouvelles portions d'alcool dissolvent de moins en moins de subs-

(2) Cette limite d'efficacité n'est cependant pas déterminée par la valeur absolue du pouvoir hapténique du précipité séparé, comme en témoignent les deux exemples donnés, mais par leur composition.

(3) Les premiers essais de fractionnements au moyen alcool méthylique ont déjà fait l'objet d'une communication préliminaire : M. Machebœuf, G. Lévy et M. Faure (114).

tance et, finalement, il reste un résidu totalement insoluble dans l'alcool méthylique bouillant.

On réunit tous les extraits méthyliques qui, à chaud, forment une solution limpide qui précipite par refroidissement à la température du laboratoire, puis à la glacière. On sépare ce premier précipité par une filtration à 0°. On concentre le filtrat au 1/3 de son volume, on le refroidit à la glacière, puis on sépare ce deuxième précipité. On concentre le nouveau filtrat au 1/3 de son volume... etc. On poursuit les mêmes opérations deux fois encore, de façon à obtenir un troisième et un quatrième précipités et une dernière solution mère.

Les activités sérologiques des six fractions obtenues sont très différentes.

	Poids p. 100	Activité hapténique
Fraction initiales [18] et [19]		1/1.500
[23] Insoluble dans l'alcool méthylique bouillant	9	1/300
[24] 1 ^{er} précipité à + 4°	14	1/500
[25] 2 ^{me} précipité à + 4° après concentration à 1/3	36	1/500-1/800
[26] 3 ^{me} précipité à + 4° après concentration à 1/9	13	1/2.000-1/3.000
[27] 4 ^{me} précipité à + 4° après concentration à 1/27 ..	12	1/2.000
[28] Solution mère du 4 ^{me} précipité	10	1/800

Par cette méthode, on sépare à l'une des extrémités du fractionnement des substances moins solubles et à l'autre extrémité de substances plus solubles dans l'alcool méthylique que les fractions intermédiaires. Les fractions de tête et de queue sont nettement les moins actives, et c'est dans les fractions intermédiaires que se concentre l'haptène (4).

(4) La purification de l'haptène par le chloroforme et l'alcool méthylique (voir ci-dessus page 112) n'enlevait à l'haptène que des lipides plus solubles sans laisser de résidu insoluble inactif.

Mais cette augmentation d'activité est hélas accompagnée d'un bien mauvais rendement. Aussi, avant d'entreprendre un nouveau fractionnement sur les précipités les plus actifs (3^{me} et 4^{me} précipités), nous avons récupéré une partie de l'haptène contenu dans les fractions voisines (2^{me} précipité et solution mère). Pour cela, on soumet séparément les deux fractions [25] (2^{me} précipité) et [28] (solution mère) à un traitement semblable au précédent, afin d'en séparer de nouvelles fractions possédant des activités sérologiques sensiblement égales à celles des 3^{me} et 4^{me} précipités. On rassemble alors toutes les fractions qui ont des pouvoirs hapténiques semblables et on les soumet à un nouveau fractionnement par la même méthode.

Nous ne décrirons pas en détails ces opérations fastidieuses qui se ressemblent toutes et ne présentent que quelques différences d'ordre quantitatif, suivant que l'on traite des fractions plus ou moins solubles. Si, par exemple, on traite une fraction peu soluble, telle que la fraction [25], pour dissoudre la majeure partie de l'haptène, il faut prolonger l'action de l'alcool pendant longtemps en employant un grand volume de solvant. Il reste cependant un résidu important pratiquement insoluble qui retient une partie de l'activité hapténique. Au contraire, si l'on traite une fraction plus soluble, telle que la fraction [28], il est aisé et rapide de mettre tout en solution ; cependant, grâce à une extraction progressive, on parvient à en séparer une petite quantité de substance inactive insoluble dans l'alcool méthylique bouillant.

On voit combien les phénomènes de solvation sont intenses pour les lipides que nous étudions. Nous donnons seulement, à titre d'exemple, le schéma du fractionnement de l'une de nos préparations (Tableau V, page 117).

Quel que soit le mode d'extraction de la matière première et l'origine de la préparation traitée (fraction soluble ou insoluble à froid de l'extrait alcoolique brut), cette méthode permet d'atteindre une activité hapténique considérable ($H = 1/3.000-1/4.000$) que l'on ne peut pratiquement pas dépasser. Cette valeur représente la limite d'efficacité de la méthode de fractionnement par l'alcool méthylique.

Du fait que l'on n'arrive plus à fractionner les lipides hapténiques par cette méthode, il ne faut naturellement pas conclure que l'on a obtenu une substance pure, mais, au contraire, chercher un nouveau procédé plus efficace.

Tableau V
Fractionnement des phosphatides
 extraits à partir de 5 kg de "Bacilles de la tuberculine"

"Phosphatides bruts"
 21,5 g
 (fractionnement par l'alcool méthylique)

A1	A2	A3	A4	A5	A6
poids: 1,5	2,4	3,9	5,4	4	4,2
H : $\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{1000}$ $\frac{1}{1500}$	$\frac{1}{2000}$ $\frac{1}{3000}$	$\frac{1}{500}$ $\frac{1}{800}$	$\frac{1}{10}$
insoluble soluble				moins soluble	très soluble
10 g					

(fractionnement par l'alcool méthylique)

B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7
poids: 0,28	0,2	3,1	0,95	3,08	4,54	1,4
$\frac{1}{200}$ $\frac{1}{500}$	$\frac{1}{800}$ $\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{2000}$ $\frac{1}{3000}$	$\frac{1}{2000}$ $\frac{1}{3000}$	$\frac{1}{3000}$	$\frac{1}{2000}$ $\frac{1}{500}$
11 g						

fractionnement par le chloroforme
et l'alcool méthylique

C1	C2	C3
poids: 3,95	0,99	5,9
H : $\frac{1}{3000}$	$\frac{1}{1500}$ $\frac{1}{2000}$	$\frac{1}{800}$ $\frac{1}{1000}$

fractionnement par l'alcool méthylique

D1	D2	D3	D4	D5
poids: 0,056	3,6	2,65	0,59	0,23
H : $\frac{1}{3000}$	$\frac{1}{3000}$	$\frac{1}{3000}$ $\frac{1}{4000}$	$\frac{1}{2000}$ $\frac{1}{3000}$	$\frac{1}{800}$

*Modification de la composition chimique au cours
des fractionnements précédents*

Les fractionnements que nous venons de décrire ont été guidés uniquement par la valeur du pouvoir hapténique, mais nous avons suivi parallèlement l'évolution de la composition chimique des fractions obtenues en fonction de leur activité sérologique. Nous avons effectué des dosages de phosphore et d'azote. Nous avons également déterminé la quantité de glucides contenus dans les fractions, en dosant les substances réductrices libérées par une hydrolyse acide (la quantité de glucides est exprimée en glucose).

Nous donnons quelques exemples dans le tableau suivant.

	Activité hapté- nique	Azote p. 100	Phos- phore p. 100	Glucides exprimés en glucose p. 100 après hydrolyse
FRACTIONS PLUS SOLU- BLES que les fractions les plus actives	1/50 1/500	1,1 0,44	4,6 3,75	0,9 1,7
FRACTIONS LES PLUS AC- TIVES	1/3.000 1/3.000 1/3.000	0,2 0,05	3,7 3,1 2,6	 6,2 9,5
FRACTIONS MOINS SOLU- BLES que les fractions les plus actives	1/300 1/200	0,1 1,7	2,06 1,7	9,9 11,1

**Evolution de la composition chimique en fonction
de l'activité sérologique au cours des fractionnements**

On constate tout d'abord que toutes les fractions obtenues sont phosphorées ; mais les teneurs en phosphore sont très inégales. Elles décroissent toujours des fractions les plus solubles aux fractions les moins solubles.

L'azote, au contraire, se concentre uniquement dans les fractions les plus solubles.

Enfin, les glucides s'accroissent dans les fractions les moins solubles. Il n'y a aucune relation quantitative entre la teneur en glucides et l'activité sérologique des fractions.

La composition des fractions les plus actives est comprise entre celles des fractions moins actives d'avec lesquelles on les a séparées : fractions plus solubles d'une part et moins solubles d'autre part. Une activité hapténique donnée ne s'accompagne pas d'une composition chimique déterminée ; cependant, lorsque cette activité croît, les grandes différences de composition observées entre des fractions peu actives s'atténuent progressivement. Lorsque l'on atteint l'activité limite que ces méthodes de fractionnement permettent d'obtenir, les fractions les plus actives ($H = 1/3.000$) possèdent encore des teneurs en phosphore et en glucides nettement différentes ; cependant ces fractions sont toutes très pauvres en azote.

On peut déjà conclure de ces résultats que :

1° L'haptène lipodique n'est vraisemblablement pas azoté.

2° Si des glucides entrent dans la constitution de l'haptène lipodique, la totalité des glucides liés aux lipides étudiés ici n'intervient pas pour déterminer son activité sérologique.

Les fractions les plus actives paraissent donc constituées par un mélange, d'où l'on sépare difficilement deux types de fractions lipidiques phosphorées : les unes, plus solubles, riches en azote et en phosphore, mais pauvres en glucides ; les autres moins solubles, riches en glucides, moins phosphorées et ne renfermant plus que des traces d'azote. Pour résoudre ce mélange et tenter d'en séparer la molécule de l'haptène, nous avons essayé d'appliquer les diverses techniques habituellement employées pour purifier les phosphatides, en choisissant celles qui ne risquaient pas d'altérer la propriété sérologique de nos préparations.

Nous avons cherché à éliminer, par ces nouvelles purifications, la petite quantité d'azote qui reste dans les fractions les plus actives ; mais nous avons surtout tenté de séparer les glucides, car on connaît le rôle prédominant de certains glucides dans la chimie des haptènes. Nous avons cherché à savoir si, dans le cas présent, on doit attribuer également à des glucides l'activité et la spécificité sérologiques de nos préparations.

Précipitation fractionnée de la solution aqueuse par l'alcool et le chlorure de sodium

Les fractions les plus actives ont une grande affinité pour l'eau ; elles donnent des solutions très visqueuses, limpides ou légèrement louches. Nous avons essayé de fractionner ces solutions par addition d'alcool, sans dépasser le taux de 50 p. 100, de façon à éliminer autant que possible les substances non lipidiques qui pourraient y rester. L'haptène ne précipite que partiellement à ce titre ; nous avons alors ajouté un sel neutre, ici le chlorure de sodium, qui a la propriété de favoriser la précipitation.

Essai. — Dans un premier essai, nous avons cherché si l'addition progressive d'alcool séparait des fractions nettement différentes.

On dissout 100 mg. d'une préparation très active ($H = 1/3.000$) dans 5 cm³ d'eau, puis on ajoute successivement les quantités d'alcool absolu nécessaires pour amener le titre de l'alcool à 25, 30, 40 et 50 p. 100. On sépare chaque fois le précipité formé. Malgré des centrifugations énergiques (1 h. à 6.000 tours-min.), les solutions mères des précipités successifs restent très troubles. On ajoute alors à l'alcool à 50 p. 100 quelques gouttes d'une solution de chlorure de sodium à 18 p. 100 : le trouble de la solution augmente et un précipité commence à se former. On poursuit les additions de chlorure de sodium ; le précipité devient de plus en plus abondant et dense, puis brusquement flocule. Il se sépare d'une solution mère parfaitement limpide où une nouvelle addition de chlorure de sodium ne fait plus apparaître aucun trouble. Pour obtenir la floculation, il faut ajouter à la solution dont le titre en alcool est 50 c., 5 p. 100 de son volume d'une solution de chlorure de sodium à 18 p. 100. Après avoir desséché le précipité obtenu par addition de chlorure de sodium, on le dissout dans du chloroforme pour le séparer du sel. On évapore à sec la solution mère du dernier précipité, puis on l'extrait également avec du chloroforme.

Les résultats de ce fractionnement sont donnés dans le tableau de la page suivante.

On voit donc que les alcools à 25,30, et même à 40 p. 100 précipitent des quantités négligeables de substances qui sont nettement actives. (Nous n'avons donc pas utilisé ces concentra-

	Poids	Activité hapténique
Fraction initiale	100 mg.	1/3.000
Précipité par l'alcool à 25 p. 100.....	1	1/1.000
» » 30 »	1	1/1.500
» » 40 »	5,7	1/1.500
» » 50 »	40,7	1/2.000
Précipité par ClNa à partir de la solution mère précédente (alcool à 50 c.)	41,2	1/4.000
Solution mère finale) Soluble dans le chloroforme....	2,4	1/800
) Insoluble dans le chloroforme..	8	trace
	(par dif- férence	

**Précipitation fractionnée de la solution aqueuse par l'alcool
puis le chlorure de sodium**

tions alcooliques dans la suite de notre travail). La petite quantité d'alcool que l'on ajoute alors à l'alcool à 40 c. pour avoir de l'alcool à 50c. provoque au contraire la précipitation d'une importante fraction. Le précipité que l'on obtient ensuite par addition de chlorure de sodium est aussi important que le précédent, mais il est plus actif. Dans la solution mère finale restent 10 p. 100 environ de substances pratiquement inactives que l'on élimine.

*Fractionnement par précipitations successives
de la solution aqueuse par l'alcool à 50 c. puis par le chlorure
de sodium*

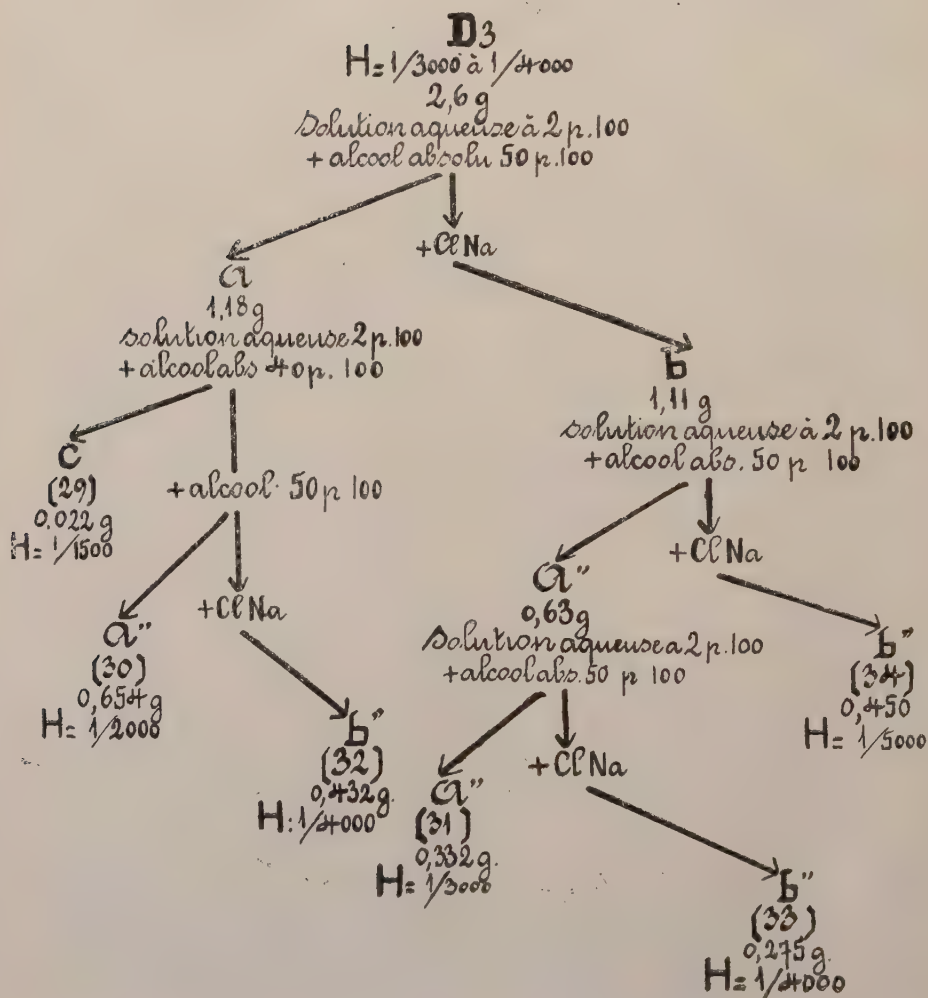
Nous avons utilisé la différence d'activité des fractions précipitées directement par l'alcool à 50 c., puis par le chlorure de sodium pour fractionner la préparation [**D₃**] (Tableau V, page 117).

On effectue une série de précipitations successives schématisées dans le tableau VI (page 122). On dénomme « a » les précipités formés sous l'action de l'alcool à 50 c. et « b » les précipités engendrés par l'addition ultérieure de chlorure de sodium.

On obtient six fractions qui possèdent des activités sérologiques très différentes.

Tableau VI

Précipitations successives de la solution aqueuse
par l'alcool à 50° et le chlorure de Sodium



Numéro des fractions		Activité hapté- nique	Phos- phore p. 100	Glu- cides p. 100
[D]	Fraction initiale	1/3.000 à 1/4.000	3,07	
[29]	Précipité par l'alcool à 40 p. 100..	1/1.500	2,90	
[30]	Précipités par l'alcool à 50 p. 100	a'' de a	1/2.000	2,90
[31]		a'' de a'	1/3.000	2,95
[32]	Précipités par le ClNa	b'' de a	1/4.000	3,07
[33]		b'' de a''	1/4.000	2,98
[34]		b'	1/5.000	3,07
				5,4

Les différences d'activités des fractions séparées ne sont pas accompagnées par des variations parallèles de leur composition chimique. Les teneurs en phosphore sont pratiquement identiques et les faibles variations des teneurs en glucides ne sont nullement en rapport avec celles du pouvoir hapténique.

L'activité sérologique du précipité b' (fraction [34]) est considérable : $H = 1/5.000$, mais cette fraction ne représente que 17 p. 100 de la préparation initiale [D₃]. A cause de ce très mauvais rendement, nous avons été obligée ici de rassembler les trois fractions les plus actives : b' et les 2 b'', afin d'avoir une quantité suffisante de substance pour en faire l'étude chimique.

Craignant que ces traitements prolongés dans l'eau n'aient hydrolysé partiellement les lipides, nous avons traité les trois fractions [32], [33] et [34] rassemblées, huit fois par de l'acétone bouillante, pour en éliminer les acides gras qui auraient pu être libérés, mais cette extraction n'a enlevé que des traces de « cires » (1 p. 100 environ). Le résidu insoluble dans l'acétone constitue la fraction très active [35] (poids : 1,017 gr., activité hapténique : $H = 1/4.500$), phosphore : 3,0 p. 100, Azote : 0,08 p. 100, glucides : 5,25 p. 100).

Purification par précipitation de la solution aqueuse par l'alcool à 50 c. et le chlorure de sodium

La méthode de fractionnement, que nous venons de décrire, permet de concentrer une partie de l'haptène lipoidique dans une

fraction qui possède une activité nettement supérieure à celle de la préparation initiale ; mais cette augmentation d'activité s'accompagne d'un très mauvais rendement. Dans la suite de ce travail, nous n'avons pas utilisé à nouveau ce procédé pour fractionner les préparations très actives. Nous avons seulement employé comme méthode de purification, la précipitation totale de la solution aqueuse sous les actions combinées de l'alcool à 50 c. et du chlorure de sodium, dans le but d'enlever la petite quantité de substances, très peu actives qui restent en solution dans ces conditions.

Pour cela, on fait une solution à 2 p. 100 de la préparation active dans de l'eau distillée ; elle est limpide ou légèrement opalescente, mais toujours très visqueuse. On ajoute un égal volume d'alcool éthylique absolu ; la solution perd sa viscosité et devient laiteuse. Puis on additionne le mélange de 5 p. 100 de son volume d'une solution de chlorure de sodium à 18 p. 100. Le précipité floccule immédiatement et il est très facile de le séparer par centrifugation. On le purifie une deuxième fois de la même manière, puis on déshydrate le précipité purifié, en l'extrayant trois fois par de l'alcool absolu. Finalement, on le dissout dans du chloroforme pour éliminer le chlorure de sodium.

On enlève ainsi 10 p. 100 de substances peu actives comme haptène, et possédant toujours un fort pouvoir hémolytique pour les hématies de mouton.

Deux exemples de purification par l'alcool à 50 c. et le chlorure de sodium		Poids p. 100	Activité hapténique	Pouvoir hémolytique
1 ^o Préparation active à 1/3.000 - 1/4.000	Précipité	91	1/3.000 à 1/4.000	1/200
	Solution mère..	9	1/800	
2 ^o Préparation active à 1/500	Précipité	87	1/500	1/50
	Solution mère..	13	1/100	

Cette purification n'abaisse que très peu la teneur en glucides des préparations actives ; par exemple de 9,5 à 8,6 p. 100 (pour la première préparation active inscrite dans le tableau précédent).

Essai de fractionnement à l'aide de pyridine

Ayant remarqué que les fractions actives étaient solubles dans la pyridine chaude, mais précipitaient par refroidissement, nous avons cherché à utiliser ces propriétés pour purifier l'haptène.

Dans ce but, on traite 100 mg. d'une préparation active à 1/3.000, par 5 cm³ de pyridine chaude employée en plusieurs fois. Il reste un petit résidu insoluble : on refroidit la solution à la glacière. On sépare le précipité formé, puis on le dissout dans 0,5 cm³ de pyridine chaude que l'on met ensuite à la glacière. On réunit, d'une part, le précipité formé par refroidissement et le premier résidu insoluble, et, d'autre part, les deux solutions pyridiniques.

	Poids	Activité hapténique	Glucides p. 100
Fraction initiale	100 mg.	1/3.000	
Insoluble dans la pyridine	31 mg.	1/2.000	5,4
Insoluble dans la pyridine	69 mg.	1/3.500 à 1/4.000	8,7

La fraction soluble dans la pyridine est nettement plus active que la fraction insoluble. Cependant, nous n'avons pas utilisé cette méthode de fractionnement, car les glucides que nous cherchons à éliminer s'accumulent ici dans la fraction la plus riche en haptène.

Fractionnement par l'acide acétique glacial et l'acétone

Nous avons alors essayé d'utiliser, pour purifier l'haptène contenu dans les fractions les plus actives, l'acide acétique glacial, solvant très employé dans l'étude des cérébrosides. Quoique l'haptène lipodique soit très sensible à l'action des acides, on peut le traiter sans l'altérer avec de l'acide acétique glacial (done non ionisé), à condition d'opérer en milieu anhydre, et d'éviter une température trop élevée et un contact trop prolongé.

Essai. — Nous avons effectué un premier essai de fractionnement avec une fraction incomplètement purifiée par l'alcool méthylique et active seulement à 1/2.000-1/3.000.

On extrait la fraction par de l'acide acétique tiède (40°) ; il reste un résidu insoluble. Par refroidissement de la solution acétique, il se forme un précipité que l'on sépare et que l'on joint au résidu insoluble. On ajoute à la solution acétique 4 volumes d'acétone, il se forme un abondant précipité que l'on sépare. Enfin on évapore à sec la solution mère acétono-acétique. On lave soigneusement les trois fractions obtenues avec de l'acétone afin d'en éliminer rapidement toute trace d'acide acétique. On obtient les résultats suivants :

	Poids p. 100	Activité hapténique
Fraction initiale		1/2.000 à 1/3.000
Fraction insoluble dans l'acide acétique glacial	21,4	1/1.500
Solution acétique { Fraction précipitée par l'acétone	42	1/4.000
{ Solution mère acétono-acétique	35,6	1/500

On voit donc que la presque totalité de l'haptène se concentre dans la fraction soluble dans l'acide acétique et précipitée par l'acétone.

*Fractionnement au moyen d'acide acétique et d'acétone
d'une préparation préalablement purifiée au maximum
par l'alcool méthylique*

On soumet à un traitement analogue 3 g. d'une fraction active à 1/3.000-1/4.000. (Cette fraction représente le terme final de la purification par le chloroforme et l'alcool méthylique, par l'alcool méthylique seul, et par l'alcool à 50 c. et le chlorure de sodium de l'haptène lipodique contenue dans les préparations solubles dans l'éther et insolubles dans l'acétone bouillante provenant de la totalité de l'extrait alcoolique des 12 kg de « Bacil-

les de la Tuberculine »). On extrait l'haptène contenu dans cette fraction par 60 cm³ d'acide acétique glacial, puis on le précipite au moyen de 200 cm³ d'acétone. On obtient les trois fractions suivantes :

	Poids	Activité hapté- nique	Phos- phore p. 100	Glucides p. 100
Fraction initiale	3 g.	1/3.000- 1/4.000		8,6
Insoluble dans l'acide acé- tique	0,81	1/2.000 à 1/3.000	2,57	12,5
Solution acétique	Précipité par l'acétone	1,42	1/4.000 à 1/4.500	5,95
	Solution mère acétono - acé- tique	0,63	1/800	2,6

On constate tout d'abord que l'augmentation relative de l'activité hapténique, à la suite de ce fractionnement, est beaucoup plus faible ici qu'avec la préparation moins active et moins purifiée utilisée dans l'essai préliminaire.

Ceci n'est d'ailleurs qu'un exemple d'un fait très général que nous avons observé au cours de tout notre travail. L'essai d'une nouvelle méthode de fractionnement peut donner d'excellents résultats lorsqu'on l'effectue avec une préparation relativement peu active ; mais lorsqu'on l'applique ensuite à une préparation déjà très active, les résultats sont toujours beaucoup moins bons, et souvent même les fractions obtenues possèdent des activités sensiblement égales. Plus une préparation est riche en haptène, plus il est difficile de faire croître son activité sérologique par un nouveau fractionnement.

Quoiqu'il en soit, dans le cas présent, ce fractionnement permet de séparer d'avec la fraction la plus riche en haptène, deux autres fractions moins actives qui possèdent des compositions chimiques très différentes. La fraction insoluble dans l'acide acétique glacial est riche en glucides et relativement pauvre en phosphore, tandis que la solution mère acétono-acétique est très pauvre en glucides et possède une teneur élevée en phosphore.

Cette méthode de fractionnement est beaucoup plus efficace du point de vue chimique que les précédentes, et elle montre clairement que nos préparations les plus actives sont encore constituées par un mélange complexe de lipides.

On extrait le précipité acétono-acétique une dizaine de fois par de l'acétone bouillante qui n'enlève que des traces (3,4 mg) de substances solubles, le résidu insoluble constitue la préparation [36] très active $H = 1/4.000-1/4.500$. Elle pèse 1,36 g., et possède la composition suivante : phosphore : 2,82 p. 100, Azote : 0,13 p. 100, glucides : 5,95 p. 100.

Nous avons encore essayé de purifier, à l'aide d'autres méthodes, l'haptène lipoidique contenu dans les préparations les plus actives ainsi obtenues. Ces essais sont tous demeurés infructueux ; nous les résumerons brièvement plus loin. Il semble bien cependant que ces fractions ne soient pas constituées par de l'haptène pur, mais par un mélange.

Nous allons étudier maintenant les propriétés et la composition des fractions les plus actives que nous avons obtenues dans ce travail.

Propriétés et composition des fractions les plus actives

Propriétés physiques des fractions

Après évaporation de leur solution chloroformique, les préparations les plus actives se présentent sous la forme d'une masse vitreuse transparente, dure et cassante ; cette masse amorphe est presque incolore, à peine teintée de jaune très pâle. L'examen au microscope polarisant montre que les fragments limités par des cassures conchoïdales ne rétablissent pas la lumière entre deux nicols croisés ; on observe seulement quelques phénomènes de polarisation chromatique, témoins de tensions internes, comme il en existe très généralement dans les substances vitreuses obtenues par évaporation de leur solution.

Les fractions les plus actives sont très solubles dans le chloroforme, l'éther et la pyridine, solubles dans l'acide acétique glacial, mais elles ne se dissolvent que dans un très grand volume d'alcool méthylique ; elles sont totalement insolubles dans l'acétone même bouillante.

Mises en contact avec de l'eau, ces préparations s'imbibent, se gonflent d'une manière homogène et donnent un véritable gel transparent et incolore ; puis, si l'on augmente la quantité d'eau, on obtient une solution très visqueuse et filante et parfaitement limpide. La viscosité est encore très importante dans une solution à 1 p. 1.000 où de fines bulles d'air emprisonnées ne remontent que très lentement à la surface. Optiquement ces solutions sont parfaites ; elles ne présentent aucun phénomène de Tyndall en lumière transmise, et aucune particule visible à l'ultramicroscope, mais d'autre part, elles se comportent comme des solutions colloïdales : précipitation réversible par les sels neutres et par acidification, incapacité totale de dialyser à travers une membrane de collodion.

Propriétés de l'haptène lipoidique contenu dans les fractions les plus actives

L'activité hapténique de ces préparations purifiées est considérable. Un volume de 0,25 cm³ de solution contenant 1/4.000^{mo} de mg. par cm³ et même 1/5.000^{mo} de mg. pour la fraction [35] suffit pour fixer totalement 2,5 doses minima d'alexine, en présence de sérum antituberculeux, dans un volume total de 1,25 cm³ ; ces doses de 0,06 γ et 0,05 γ agissent alors dans un milieu où les fractions actives sont diluées à 1/80.000.000 et 1/100.000.000.

Ces préparations, si actives comme haptène de déviation, sont totalement dépourvues de la propriété haptène de précipitation, quelle que soit la dilution employée.

Ces préparations sont également dénuées de toute propriété antigénique in vivo. Six injections intraveineuses à des lapins, de 5 mg. des phosphatides totaux non fractionnés (fraction soluble dans l'éther insoluble dans l'acétone bouillante de l'extrait alcoolique) n'a donné naissance à aucun anticorps. Quelle que soit la quantité de fraction très active (de 2 mg. à 0,005 mg.) que l'on administre à des souris en 5 injections intraveineuses ou intrapéritonéales, il ne se forme pas trace d'anticorps chez ces animaux.

On a donc un *haptène strict de déviation*.

Cette propriété sérologique résiste très bien à la chaleur dans le bacille total, nous l'avons déjà vu, mais également dans les

fractions les plus actives, à condition d'être en milieu parfaitement neutre. Après stérilisation par chauffage à l'autoclave à 120° pendant 45 minutes, l'activité des solutions à 1 p. 1.000 et 1 p. 10.000 dans l'eau distillée et dans l'eau physiologique n'est nullement diminuée. Elle persiste presque en totalité après dix mois de conservation en ampoule scellée et stérile.

L'haptène contenu dans ces préparations est très adsorbable : lorsque l'on filtre une solution neutre à 1 p. 1.000 à travers une bougie Chamberland L₂, l'activité diminue de 50 p. 100 et si l'on filtre une solution à 1 p. 10.000 à travers une bougie moins poreuse L₃, le filtrat ne renferme plus que 10 p. 100 de l'activité contenue dans la solution avant la filtration. Ce phénomène est fortement influencé par la réaction du milieu ; l'adsorption de l'activité est totale en milieu acide (pH : 4,7), tandis qu'elle est nulle en milieu alcalin (pH : 10,7).

Composition chimique des fractions les plus actives

Toutes les préparations actives que nous avons obtenues étant des fractions et non des substances pures, elles se ressemblent, mais ne sont pas identiques. Mais tandis que des fractions relativement peu actives ($H = 1/1.500$) peuvent avoir des teneurs en phosphore, en azote et en glucides, très différentes suivant leur origine, on voit l'haptène se concentrer, lors des purifications, dans des fractions de compositions de plus en plus voisines ; les teneurs en phosphore tendent vers 3 p. 100, les teneurs en azote vers 0,1 p. 100, et celles des glucides vers 5 p. 100.

Cette limite, atteinte progressivement à la suite de fractionnements successifs qui séparent incomplètement des substances très voisines, ne paraît pas, malgré tout, définir une entité chimique, mais plutôt un mélange, une espèce d'eutectique pratiquement irrésoluble par les moyens que nous avons mis en œuvre.

Il est en effet intéressant de constater que les fractions les plus actives que nous avons préparées sont très semblables malgré des traitements différents. Par exemple, la fraction [35] (page 123) a été isolée à partir d'un extrait alcoolique (soluble à froid) de bacilles, traités seulement par l'acétone froide, et la dernière purification a été effectuée par précipitation fractionnée de la solution aqueuse par l'alcool à 50 c., puis le chlorure de sodium. La fraction [36] (page 127) provient de l'extrait

alcoolique (en majeure partie insoluble à froid) de bacilles épuisés par l'acétone chaude, et la dernière purification a été faite au moyen d'acide acétique glacial et d'acétone.

Frac-tions	Activité hapténique	Phosphore p. 100	Azote p. 100	Glu-cides p. 100	Acides gras p. 100
[35]	1/4.500	3,0	0,08	5,25	55
[36]	1/4.000 à 1/4.500	2,82	0,13	5,95	56

Toutes les fractions actives sont très riches en acide gras. L'hydrolyse acide en libère de 55 à 60 p. 100.

Les recherches du soufre, dans la fraction [35], à l'état de sulfoeyanure, après fusion avec du sodium (méthode de Lassaigne) et à l'état de sulfate après calcination en milieu oxydant, ont été entièrement négatives. Les préparations actives sont phosphorées, cependant leurs cendres ne contiennent pas d'acide phosphorique libre (coloration jaune du méthyle orange), mais des phosphates. Comme nous ne possédions que de petites quantités de matières, nous nous sommes adressée à une méthode spectrographique pour faire l'analyse complète des cations.

Nous avons effectué une première analyse avec les cendres d'une fraction incomplètement purifiée, mais qui n'avait pas été au contact avec du chlorure de sodium. A l'aide d'un spectrographe de Ferry, nous avons photographié le spectre d'arc des cendres déposées dans un petit cratère creusé dans une électrode de carbone. Sur la même plaque nous avons enregistré le spectre d'arc des électrodes de carbone seules, afin d'en connaître les impuretés, et celui du fer, comme spectre de référence. La lecture du spectrogramme décèle la présence, en quantités grossièrement équivalentes de sodium, de calcium et de magnésium, éléments caractérisés par les raies et doublets suivants :

Na : 5896 - 5890, 5688 - 5682, 3303 - 3302, 2852 Å.

Ca : 3968, 3933, 3181, 3179, 3159.

Mg : 3337, 3330, 2803, 2796, 2788, 1778.

On aperçoit également les raies du phosphore : (2555-2554, 2535-2534), les raies limites du fer (3441, 3021) simple impurété, les raies limites du cuivre (3380, 3274, 3248) introduit par

la flamme du brûleur ayant servi à calciner la substance et enfin une raie de silicium (2882) provenant de l'attaque de la capsule de silice par les cendres phosphorées.

Dans le chapitre suivant nous décrirons le spectrogramme des cendres de la fraction [36] qui, d'ailleurs, possèdent les mêmes cations.

En résumé, les fractions les plus actives renferment seulement des traces d'azote; elles sont riches en phosphore, elles contiennent des cations et de grosses quantités d'acides gras combinés; elles sont solubles dans l'éther et le chloroforme, mais elles sont solubles dans l'éther et le chloroforme, mais elles sont totalement insolubles dans l'acétone bouillante. Ces propriétés rappellent, en tous points, celles des sels des acides phosphatidiques dont Chibnall et Channon (31) ont découvert l'existence dans les plantes. *Les préparations les plus actives semblent donc être constituées, au moins partiellement, par des sels de sodium, de calcium, et de magnésium d'acides phosphatidiques* ⁽⁵⁾.

Essais infructueux de fractionnement des préparations les plus actives

Essais de libération et de purification de l'acide phosphatidique contenu dans les fractions actives

L'étude des propriétés et de la composition des préparations actives nous a conduit à supposer que ces fractions contenaient des sels d'acides phosphatidiques. Ayant émis cette hypothèse, nous avons cherché à savoir si les acides phosphatidiques constituaient la totalité de ces fractions, ou si, au contraire, ils étaient mélangés à d'autres lipides, et, dans ce cas, à quelle partie était liée la propriété hapténique. Pour effectuer ces recherches, nous nous sommes basée sur les travaux de Chibnall et Channon (31), (172), (30), qui ont découvert l'acide glycérophosphatidique à l'état de sel de calcium dans les feuilles des végétaux. Ces auteurs obtiennent ce sel de calcium sous la forme d'une prépara-

(5) Nous employons ici le terme acide phosphatidique au sens général du mot : lipide phosphoré résultant de l'estérification par des acides gras d'un polyol, qui, lui-même, est estérifié par de l'acide phosphorique sans spécifier la nature du polyol.

tion brute, soluble dans l'éther, et insoluble dans l'acétone bouillante. Sous l'action d'un acide minéral dilué, ils libèrent l'acide phosphatidique de son sel et ils obtiennent ainsi un acide soluble dans l'acétone. Grâce à cette solubilité, il est facile de séparer l'acide phosphatidique d'avec d'autres substances qui sont restées insolubles dans l'acétone (telles la lécithine et la céphaline). Ensuite, ils purifient l'acide libre, en formant son sel de plomb en présence d'acide acétique, qui empêche les acides faibles comme les acides gras de se combiner avec le plomb. Enfin, ils précipitent le phosphatide de plomb à partir de sa solution étherée au moyen d'alcool, tandis que les acides gras libres restent en solution.

Nous avons cherché à appliquer ces techniques ; mais pour réaliser ces opérations très simples en théorie, nous nous sommes heurtée à de très grosses difficultés. Tout d'abord, nous avons été gênée par l'extrême fragilité de nos préparations, qui, sous l'action des acides minéraux dilués, libèrent une partie de leurs acides gras ⁽⁶⁾. Pour libérer l'acide phosphatidique de ses sels, il faut donc ici faire agir un acide minéral très dilué, le laisser en contact le moins longtemps possible, et enfin l'éliminer en lavant abondamment avec de l'eau, l'acide phosphatidique dissous dans de l'éther. Mais, d'autre part, nos préparations actives réagissent d'une manière très lente et très incomplète, et enfin, lorsqu'on essaye de laver les solutions étherées, il se forme des émulsions considérables, même après l'action de l'acide minéral. Ces derniers faits conduisent à se placer dans des conditions expérimentales inverses de celles qui viennent d'être indiquées.

Nous avons essayé de libérer et de séparer des acides phosphatidiques à partir de trois fractions actives différentes, mais quelles que furent les précautions prises et les artifices employés, le traitement effectué a toujours été accompagné par une décomposition importante des fractions traitées, et par la destruction d'une grande partie de l'haptène.

Nous avons cependant obtenu, en petite quantité, des fractions correspondant au sel de plomb purifié de l'acide glycérophosphatidique de Chibnall et Channon. Nous avons alors

(6) Cette action hydrolysante est telle que nous l'avons employée pour libérer la totalité des acides gras d'une fraction active après quelques jours de contact avec de l'acide sulfurique normal.

converti le sel de plomb en sel de sodium. Le produit final possède une activité nettement inférieure à celle de la fraction initiale (qui était $H = 1/2.000$), mais cependant très notable ($H = 1/800$). Ce résultat ne permet de tirer aucune conclusion.

Pour éviter la décomposition de fractions actives sous l'action des acides minéraux, nous avons tenté d'obtenir directement le sel de plomb de l'acide phosphatidique (le glycérophosphatide de plomb est insoluble dans l'eau), en faisant agir de l'acétate neutre de plomb sur la solution aqueuse d'une préparation active. Il se forme bien dans ces conditions un précipité insoluble dans l'eau, mais qui doit être constitué par un complexe de la substance avec de l'acétate de plomb. En effet, le précipité traité par de l'hydrogène sulfuré donne une préparation dont les propriétés sont sensiblement les mêmes que celles de la fraction initiale. Cependant, malgré ce traitement très doux, une décomposition se produit ; l'activité hapténique est, en effet, deux fois moindre. D'autre part, la solution mère (privée de l'excès de plomb par de l'hydrogène sulfuré) ne renferme pas d'haptène.

Essais d'élimination des glucides par dissolution de la fraction active dans l'eau, puis passage dans une phase éthérée en présence d'un acide minéral dilué, suivie d'une neutralisation de la substance active par le bicarbonate de sodium.

Nous avons vu que, si l'on met une solution éthérée d'une fraction active en contact avec de l'eau, une partie de l'haptène passe dans la phase aqueuse, mais si l'on acidifie la phase aqueuse, l'haptène passe en totalité dans la phase éthérée.

Nous avons tenté d'utiliser cette propriété pour purifier les fractions actives, et surtout pour essayer de séparer les glucides qu'elles contiennent.

A quel état sont ces glucides ?

S'ils avaient été à l'état d'osides libres, ils auraient dû être éliminés, grâce à leur insolubilité dans le chloroforme et dans l'éther, mais on connaît le très grand pouvoir dissolvant que possèdent les phosphatides qui sont capables d'entraîner en

solution des substances même non lipidiques. D'autre part, les lavages des solutions éthérées par de l'eau pure étant impossibles, nous avons ajouté des quantités importantes d'acétone et de chlorure de sodium qui possèdent également la propriété d'insolubiliser les grosses molécules osidiques. De même, bien des osides sont insolubles dans l'alcool à 50 c. en présence de chlorure de sodium. Un léger doute subsiste donc, et l'on peut encore se demander si les glucides présents dans ces fractions ne sont pas une simple impureté entraînée.

L'action d'une légère acidité, au contraire, ne permet pas à des molécules purement osidiques de passer d'une phase aqueuse dans une phase éthérée.

Expérience. — On dissout la fraction active dans de l'eau, puis on ajoute une petite quantité d'acide sulfurique dilué qui fait apparaître un précipité. On laisse en contact pendant deux heures (afin de libérer l'acide phosphatidique de ses sels). On extrait alors la phase aqueuse acide avec de l'éther. On sépare la phase éthérée.

D'une part, il est pratiquement impossible de laver la solution éthérée avec de l'eau afin d'en éliminer la petite quantité d'acide sulfurique qui s'y trouve, car, en absence d'acide minéral, l'haptène passe à nouveau dans la phase aqueuse. D'autre part, il est nécessaire de neutraliser l'acide phosphatidique libre, car, sous l'action de sa propre acidité, il s'autohydrolyse et ses acides gras sont libérés. Afin d'éviter l'action d'un alcali fort auquel l'haptène est extrêmement sensible, on neutralise donc la solution éthérée par agitation avec une solution aqueuse de bicarbonate de sodium ⁽⁷⁾. Après 15 minutes de contact, on précipite les substances hapténiques par addition d'acétone et de chlorure de sodium au mélange. Enfin, on élimine l'excès de bicarbonate de sodium en précipitant deux fois le précipité précédent à partir de sa solution aqueuse au moyen d'acétone à 50 p. 100 et de chlorure de sodium. Cette expérience a été effectuée avec une fraction relativement peu active ($H = 1/2.000-1/3.000$), on a prélevé trois prises d'essais sur lesquelles on a fait agir des acides sulfuriques N, N/10 et N/100.

(7) Un essai préliminaire avait montré que le bicarbonate de sodium n'altérait nullement l'haptène, même lorsque le contact était prolongé pendant 2,5 heures.

		Activité hapténique	Glucides p. 100
Fraction initiale		1/2.000-1/3.000	5,6
Phases éthérées neutralisées par CO_2NaH après action de	SO_3H N/1 ..	1/2.000 à 1/2.500	5
	» N/10 ..	1/2.000 à 1/3.000	4,2
	» N/100 ..	1/2.000 à 1/3.000	4,5

On voit donc que ce traitement permet d'abaisser légèrement la teneur en glucides de la fraction initiale ; (la meilleure élimination est réalisée sous l'action de l'acide sulfurique N/10). La majeure partie des glucides passe néanmoins dans la phase éthérée et ce passage ne peut s'expliquer que si l'on admet qu'ils sont inclus dans une molécule lipidique. Il est donc inutile d'essayer de séparer ces glucides d'avec le mélange des lipides qui constituent les fractions actives par de simples lavages des solutions éthérées avec de l'eau. Le fait que ces glucides sont sous une forme lipidique explique également leur solubilité dans le chloroforme et l'éther.

Afin d'abaisser la teneur en glucides, nous avons tenté d'appliquer cette méthode à une fraction très active ($\text{H} = 1/4.000$), mais nous avons échoué une fois de plus, car ces préparations très riches en haptène ont une affinité telle pour l'eau que la moitié de la fraction active reste dans la phase aqueuse en présence de l'éther, même au contact d'acide sulfurique N/10.

Essais de fractionnement par précipitation de la solution alcoolique par le chlorure de cadmium

Nous avons tenté de fractionner les lipides contenus dans les fractions actives par addition d'une solution de chlorure de cadmium à leur solution alcoolique. Nous avons obtenu des résultats inconstants. Lorsqu'on s'adresse à une fraction riche en phosphatides très solubles dans l'alcool, l'haptène reste en majeure partie dans la solution mère du précipité chloro-cadmique. Si, au contraire, on utilise une fraction peu soluble dans l'alcool, la plus grande partie de l'haptène est contenue dans le précipité chloro-cadmique.

On voit donc que la précipitabilité de l'haptène par le chlorure de cadmium dépend des lipides qui l'accompagnent ; elle ne représente pas, dans ces conditions, une propriété propre de sa molécule.

Nous n'avons pas utilisé ce procédé, car il est difficile de séparer l'haptène d'avec le chlorure de cadmium et, d'autre part, il ne permet pas d'augmenter d'une quantité appréciable l'activité des fractions.

Essais de fractionnement par précipitation fractionnée de la solution aqueuse au moyen d'alcool méthylique

Nous avons vu comment des précipitations successives de la solution aqueuse d'une fraction active au moyen d'alcool à 50 c., puis de chlorure de sodium permettaient d'effectuer un fractionnement. Nous avons essayé de fractionner à nouveau la fraction la plus active [35] (page 123) en précipitant sa solution aqueuse par des quantités croissantes d'alcool méthylique au-dessus du taux de 50 p. 100. Nous avons séparé ainsi dix fractions qui présentaient des activités hapténiques rigoureusement identiques et des teneurs en glucides très faiblement différentes (de 4,8 à 5,4 p. 100).

Ce procédé de fractionnement appliqué à une préparation très riche en haptène ($H = 1/4.500$) est donc totalement inefficace tant du point de vue chimique que du point de vue sérologique.

A la suite de ces multiples fractionnements, les préparations les plus actives paraissent encore constituées par un mélange complexe de lipides phosphorés très difficiles à séparer. Au cours des divers fractionnements, nous avons vu les fractions les plus actives se séparer lentement et progressivement d'avec deux autres types de fractions moins actives. Les unes sont plus solubles dans l'alcool méthylique et l'acide acétique glacial que les fractions plus actives ; elles sont également plus riches en phosphore et en azote, mais plus pauvres en glucides. Les autres, au contraire, sont moins solubles dans l'alcool méthylique et l'acide acétique glacial que les fractions les plus actives ; elles sont plus pauvres en phosphore, elles ne contiennent plus que des traces d'azote, mais elles sont plus riches en glucides.

Les fractions les plus actives apparaissent, tant par leurs propriétés que par leur composition, comme un mélange des deux autres fractions moins actives et non comme une molécule définie. Malgré de multiples tentatives, nous n'avons pas réussi à résoudre le mélange dans lequel se concentre l'haptène. Afin de connaître au moins une partie des impuretés qui accompagnent la molécule de l'haptène, nous avons entrepris l'étude des deux types de fractions moins actives après avoir éliminé la petite quantité d'haptène qu'elles contenaient, connaissant alors la nature de ces impuretés, nous pouvions espérer trouver plus facilement un moyen de les éliminer, puis, par une étude comparative des deux types de fractions peu actives et des fractions les plus actives, découvrir un constituant spécifique de ces dernières.

2. SEPARATION ET ETUDE DES FRACTIONS INACTIVES PLUS SOLUBLES DANS L'ALCOOL METHYLIQUE QUE LES FRACTIONS LES PLUS ACTIVES

Nous avons tout d'abord cherché à obtenir des préparations très solubles dans l'alcool méthylique froid et aussi peu actives que possible. Nous nous sommes adressée aux fractions solubles à froid des extraits alcooliques de bacilles. Nous avons pu éliminer rapidement l'haptène contenu dans ces fractions grâce à une série de dissolutions dans le minimum d'alcool méthylique à 15°, suivie de l'élimination du précipité qui se forme après refroidissement à la glacière.

On obtient rapidement par exemple, à partir de la fraction **[A₆]** (Tableau V, page 117) une préparation ne possédant plus trace d'activité hapténique même à la concentration de 1 mg. par cm³ (elle est donc plus de 4.000 fois moins active que les fractions les plus actives). On purifie d'abord cette fraction en éliminant des petites quantités de substances les unes insolubles dans l'éther, les autres solubles dans l'acétone bouillante. Puis, afin de séparer l'azote qui ne serait pas sous une forme lipidique, on dissout la fraction précédente dans de l'eau et on précipite les phosphatides par addition d'un égal volume d'acétone, puis de 5 p. 100 d'une solution de chlorure de sodium à 18 p. 100. On répète trois fois cette opération, on déshydrate par de l'acétone le précipité obtenu, puis finalement, on le dissout dans le chloroforme pour éliminer le chlorure de sodium.

L'évaporation de la solution chloroformique laisse une masse amorphe, vitreuse, dure et cassante et fortement colorée en brun jaune orangé. Cette préparation est très soluble dans le chloroforme, l'éther et l'alcool méthylique, mais elle est totalement insoluble dans l'acétone même bouillante. Elle donne avec l'eau une solution parfaitement limpide, colorée en jaune orangé et très visqueuse. Elle présente la composition suivante :

Fraction **[37]** : P : 5,65 p. 100 - N : 0,75 p. 100

Glucides : 0,7 p. 100

(Nous avons négligé la très faible quantité de glucides). La richesse en phosphore et la teneur relativement faible en azote, permettent de supposer que cette préparation renferme un mé-

lange de sels d'acides phosphatidiques et de lipides azotés, mais quelle est la nature de la fraction azotée ?

Nous nous sommes assurée tout d'abord que l'azote n'était pas à l'état d'ion ammonium saturant une acidité phosphorique d'un acide phosphatidique. En effet, si l'on traite en solution éthérée de la préparation avec de l'acide sulfurique N/10, on ne trouve pas d'ion ammonium dans la phase aqueuse. La totalité de l'azote reste dans la phase éthérée où il est vraisemblablement constituant d'une molécule lipidique.

Nous avons alors supposé que la préparation contenait de la lécithine, composé si répandu parmi les êtres vivants ; en effet, si les bacilles tuberculeux renferment de la lécithine, c'est dans cette fraction soluble dans l'alcool et insoluble dans l'acétone qu'on doit la retrouver.

Ayant émis cette double hypothèse (existence d'un mélange de sels d'acides phosphatidiques et de lécithine), nous avons entrepris la séparation de la lécithine d'avec les sels d'acides phosphatidiques en nous basant sur les travaux de Chibnall et Chanon que nous avons décrits plus haut (page 132).

(Les opérations qui suivent sont schématisées dans le tableau VII, page 141).

On dissout 0,98 g. de la préparation [37] dans de l'eau, puis on libère les acides phosphatidiques de leurs sels en faisant agir de l'acide sulfurique N/10. Après 3 heures de contact avec l'acide minéral, on extrait les lipides avec de l'éther. On lave la solution éthérée avec de l'eau alcoolisée contenant du sulfate de sodium, afin de casser les émulsions qui se forment. On déshydrate la solution éthérée par du sulfate de sodium anhydre, puis, après l'avoir évaporée à sec, on dissout le résidu dans du chloroforme.

L'addition d'acétone à la solution chloroformique fait apparaître un précipité [P_1] qui doit contenir les lipides azotés (du type lécithine), tandis que les acides phosphatidiques libres, solubles dans l'acétone, doivent demeurer dans la solution mère [S_1]. Mais on sait que ces deux types de substances se solvant mutuellement et une simple précipitation au moyen d'acétone ne permet pas une séparation quantitative. On purifie le précipité [P_1] en le traitant par de l'acétone bouillante que l'on sépare après refroidissement. Pour purifier les acides phosphatidiques contenus dans la solution [S_1], on dissout la substance dans un petit volume d'acétone, puis on élimine la fraction la moins

Tableau VII

Déparation des Acides phosphatidiques d avec les Phosphatides azotés

Fraction (F₁)
 P: 5,68 p. 100
 N: 0,75 p. 100
 Hapt: néant
 986 mg

traité par SO₃ + H₂ N₁₀ pendant 2 h
 extrait par l'éther

Solution étherée

laxée, évaporée à sec, dissoute dans du chloroforme

Solution chloroformique
 + acétone

Précipité (P₁)
 traité 3 fois par l'acétone bouillante
 extraits acétoniques séparés
 à +15°

Solution (S₁)
 évaporée à sec, dissoute dans de l'acétone
 refroidi à -5° → précipité
 précipité extrait 2 fois par de l'acétone à -5°

Insolubles (P₂)
 dissous dans du chloroforme
 + acétone
 + +°

Solubles (S₂)
 évaporés à sec, dissous dans de l'éther
 solution étherée + acétone (-5°) → précipité
 précipité traité 3 fois par de l'acétone chaude et séparé

Précipités (P₃)
 dissous dans du chloroforme
 + acétone
 + +°

Solutions (S₃)
 évaporées à sec, dissoutes dans de l'acétone
 refroidi à -5° → précipité
 précipité extrait 3 fois par de l'acétone à 15°

Précipité (P₄)
 extrait 3 fois par de l'acétone
 bouillante

Solutions (S₄)
 évaporées à sec, dissoutes dans un volume
 d'acétone à 15° 2 fois plus grand que le précédent
 refroidi à -5° → précipité
 précipité extrait 3 fois par de l'acétone à 15°

Insoluble (P₅)
 "phosphatides azotés"
 (Lécithine?)
 102 mg
 phosphore: 7,98 p. 100
 Azote: 1,88 p. 100

Solutions (S₅)
 traitées comme (S₄), mais par un volume
 plus grand d'acétone

Solutions (S₆)
 "acides phosphatidiques"
 652 mg
 phosphore: 47,09 p. 100
 Azote: 0,33 p. 100

Solubles (S')
Insolubles (P')

soluble qui précipite par refroidissement à — 5°. On répète ces purifications trois fois, mais afin d'avoir un meilleur rendement, on rassemble après chaque opération d'une part les fractions les plus solubles dans l'acétone, d'autre part les fractions insolubles dans ce solvant.

On purifie alors séparément le précipité [**P₃**], deux fois encore, de façon à le priver de toutes substances solubles dans l'acétone chaude. On obtient une fraction [**P₅**] pesant 0,1 g., riche en phosphore (7,98 p. 100). C'est dans cette fraction que l'on doit trouver la lécithine si la préparation initiale [**37**] en contenait. (Nous étudierons plus loin cette fraction [**P₅**]).

On purifie également la fraction [**S₃**] soluble dans l'acétone, mais il est très difficile d'éliminer la petite quantité de substances insolubles dans l'acétone qu'elle contient encore. La fraction [**83**] se dissout très facilement dans un petit volume d'acétone à 15°, mais, lorsque l'on refroidit cette solution à — 5°, il apparaît un précipité. Si l'on sépare ce précipité et si on l'extrait avec des petites quantités d'acétone à 15°, il reste alors un résidu insoluble. (Ce résidu est insoluble dans l'acétone même bouillante, il était donc solvaté par les lipides solubles dans l'acétone froide). Ces phénomènes de solvation sont d'autant plus intenses que l'on opère en solution plus concentrée. C'est pourquoi on purifie les produits solubles dans l'acétone, deux fois encore, de la même manière, mais en employant de plus grands volumes d'acétone. Après chaque purification on sépare une petite quantité de substances insolubles dans l'acétone : fraction [**P'**]. On obtient finalement une fraction [**S₆**] très soluble dans l'acétone froide contenant 4,09 p. 100 de phosphore, mais encore 0,33 p. 100 d'azote. Malgré des purifications répétées, la séparation des lipides azotés insolubles dans l'acétone n'a pas été complète. On voit à quel point les phénomènes de solvation sont intenses avec les substances de ce type. Nous avons décrit cette expérience en détail, afin de donner un exemple des phénomènes de solubilisations réciproques que nous avons constamment observés au cours de notre travail et qui ont gêné considérablement les fractionnements.

Fraction azotée [**P₅**] insoluble dans l'acétone

Nous avons supposé que la préparation initiale [**37**] contenait de la lécithine. Après l'action de l'acide sulfurique dilué, la lécithine (si elle existe) n'a pas été modifiée. On doit donc la

retrouver dans cette fraction azotée [P_5] insoluble dans l'acétone. Mais si une petite quantité de sel d'acide phosphatidique n'a pas été décomposée par l'acide minéral dilué, c'est également dans cette fraction insoluble dans l'acétone que l'on doit la retrouver. Pour libérer l'acide phosphatidique qui pourrait encore exister à l'état de sel, on émulsionne la fraction [P_5] dans de l'eau, puis on la laisse au contact d'acide chlorhydrique dilué pendant 2 heures. On précipite alors les lipides par addition d'acétone (50 p. 100) et de chlorure de sodium ; on répète, deux fois encore, la précipitation à partir de l'émulsion aqueuse, afin de bien éliminer l'acide chlorhydrique. On dissout le précipité au moyen d'acétone. (La solution mère chloroformo-acétonique ne contient qu'une infime quantité de substances : 3,4 mg.). D'après notre hypothèse, le précipité insoluble dans l'acétone serait constitué par de la lécithine : en réalité il n'en est rien, car il est insoluble dans l'éther (même hydraté). Il est cependant de nature lipidique, car il est soluble dans le chloroforme et libère des acides gras par hydrolyse sulfurique à 120°. Il est riche en azote (2,44 p. 100) et en phosphore (5,87 p. 100). Par évaporation de sa solution chloroformique, il se présente sous la forme d'une masse brune, dure et cassante. Ce produit est soluble dans l'alcool à 96 c., ce qui explique sa présence parmi les phosphatides solubles dans l'alcool froid. Quoique insoluble dans l'éther, ce lipide azoté n'a pas été éliminé totalement lorsque l'on a dissous la préparation initiale [37] dans de l'éther ; une partie a été solvatée par les autres lipides très solubles dans ce solvant.

Nous avons également recherché directement la choline dans les produits d'hydrolyse sulfurique de la préparation initiale [37]. Pour cela, après avoir séparé les acides gras, nous avons précipité l'acide sulfurique à l'état de sulfate de baryum qui fut séparé par filtration. Quelle que soit la concentration à laquelle on emploie le filtrat, l'addition de réactif iodo-ioduré donne un précipité brun amorphe qui ne présente pas trace de cristaux d'iodure de choline ⁽⁸⁾.

On peut donc conclure que les « *Bacilles de la tuberculine* » ne contiennent pas de lécithine.

(8) Nous n'avons pas recherché l'amino-éthanol qui entre dans la composition de la molécule de la céphaline. En effet, la céphaline est très peu soluble dans l'alcool et si les phosphatides extraits des « *Bacilles de la Tuberculine* » en avaient contenu, elle se serait concentrée dans les fractions peu solubles dans l'alcool au cours des divers fractionnements. Or ces fractions ne renferment que des traces infimes d'azote ; il est donc inutile de rechercher de l'amino-éthanol.

Nous n'avons pas poursuivi l'étude de cette fraction lipidique azotée, d'une part parce qu'on ne la retrouve pas dans les fractions les plus riches en haptène, d'autre part parce qu'elle ne représente dans notre travail qu'une impureté insoluble dans l'éther, mais solvatée par les phosphatides solubles dans ce solvant.

Fraction [S₆] très soluble dans l'acétone froide

Cette fraction doit contenir les acides phosphatidiques libres. Mais ces acides phosphatidiques libres ont subi une longue série de fractionnements au cours desquels une partie des acides gras a été libérée. Pour séparer les acides phosphatidiques d'avec les acides gras libres, nous avons employé également la technique de Chibnall et Channon dont nous résumons le principe. On dissout la fraction acétono-soluble dans de l'éther, puis on agite la solution étherée avec une solution aqueuse d'acétate de plomb contenant de l'acide acétique. Il se forme du phosphatide de plomb ; mais grâce à la présence d'acide acétique, les savons de plomb ne peuvent pas se former, donc les acides gras restent libres. Le glycérphosphatide de plomb est à l'état de solution dans la phase étherée ; mais, par addition d'alcool, il précipite, tandis que les acides gras libres demeurent en solution éthéro-alcoolique. Enfin on libère à nouveau l'acide phosphatidique de son sel de plomb en agitant sa solution étherée avec de l'acide sulfurique dilué. L'acide glycérphosphatidique isolé par les auteurs précédents à partir des feuilles du Chou, se présente sous la forme d'une huile très épaisse, très soluble dans l'acétone, mais insoluble dans l'eau, contenant 4,42 p. 100 de phosphore. (La teneur en phosphore dépend naturellement du poids moléculaire des acides gras inclus dans la molécule).

Nous avons soumis la fraction [S₆] à un traitement analogue. Nous avons obtenu, d'une part, une quantité importante d'acides gras libres et, d'autre part, une fraction qui correspond à l'acide glycérphosphatidique. Cette fraction se présente sous la forme d'une masse très molle, colorée en jaune brun ; elle est très soluble dans l'acétone, mais insoluble dans l'eau. Elle est très acide au tournesol et contient 4,17 p. 100 de phosphore. L'hydrolyse sulfurique à 120° sépare des acides gras d'avec un composé organique phosphoré soluble dans l'eau. Cette fraction phos-

phorée, soluble dans l'acétone est donc constituée par des acides phosphatidiques ⁽⁹⁾.

Conclusions

1° Les « Baciles de la Tuberculine » ne contiennent pas de lécithine.

2° Les phosphatides très solubles dans l'alcool méthylique froid, inactifs comme haptène, sont constitués par des sels d'acides phosphatidiques solubles dans l'éther. Ils sont souillés par une petite quantité d'impuretés lipidiques azotées et phosphorées insolubles dans l'éther qui a été entraîné par solvation.

Afin d'étudier la constitution chimique de ces acides phosphatidiques, nous avons préparé une nouvelle quantité de phosphatides très solubles dans l'alcool méthylique et inactif comme haptène.

Dans ce but on dissout la fraction [22] (page 114) dans le minimum d'alcool méthylique à 15°. On refroidit à + 4° puis on sépare le précipité qui s'est formé. On traite la solution mère une deuxième fois de la même manière. On purifie alors la fraction la plus soluble dans l'alcool méthylique à + 4° en la précipitant trois fois à partir de sa solution aqueuse par un égal volume d'acétone et du chlorure de sodium, puis on dissout le précipité dans du chloroforme pour éliminer le chlorure de sodium. On obtient une préparation [38] dont l'activité hapténique est très faible ($H < 1/10$). Elle possède la composition suivante :

Phosphore : 4,39 p. 100 - Azote : 0,67 p. 100

Glucides : 0,42 p. 100

Ses propriétés sont identiques à celles de la fraction [37] étudiées précédemment.

Nous étudierons la constitution chimique de cette préparation dans le chapitre suivant (page 181).

(9) Lorsque l'on agite la solution étherée de [S6] avec la solution acétique d'acétate de plomb, il se forme un précipité insoluble dans l'éther et dans l'eau. Sous l'action de l'acide sulfurique dilué, ce précipité libère également un acide phosphatidique soluble dans l'acétone, insoluble dans l'eau et contenant 5,4 p. 100 de phosphore. Nous avons comparé les acides phosphatidiques provenant les uns de sels de plomb solubles dans l'éther, les autres de sels de plomb insolubles dans l'éther. L'hydrolyse sulfurique à 120° a libéré dans les deux cas des produits analogues ; d'une part les acides gras possédant des indices d'iode semblables, d'autre part, dans les deux cas, de l'acide glycérophosphorique. Ce fait permet de conclure que la fraction [S6] est constituée uniquement par des acides glycérophosphatidiques. Dans le chapitre suivant, nous étudierons en détail la composition chimique de ces acides phosphatidiques.

3. SEPARATION DES FRACTIONS PEU ACTIVES MOINS SOLUBLES DANS L'ALCOOL METHYLIQUE QUE LES FRACTIONS LES PLUS ACTIVES

Tandis qu'il est aisé d'obtenir des fractions très solubles dans l'alcool méthylique froid pratiquement privées d'haptène, il est au contraire beaucoup plus difficile de séparer des fractions très peu solubles dans l'alcool méthylique bouillant ne possédant plus qu'une faible activité fixatrice.

Ces fractions peu actives, moins solubles dans l'alcool méthylique que les fractions les plus actives, ont été obtenues à partir des lipides solubles dans l'éther et insolubles dans l'acétone bouillante provenant de la fraction insoluble dans l'alcool froid de l'extrait alcoolique des bacilles. Ces lipides ont été fractionnés par l'alcool méthylique suivant la technique décrite précédemment (page 114). Afin de ne pas entraîner une trop grosse quantité d'impuretés totalement différentes des substances contenues dans les fractions les plus actives, nous avons laissé de côté les résidus insolubles dans l'alcool méthylique bouillant. Nous avons seulement recueilli et rassemblé les fractions qui précipitent par refroidissement des solutions méthyliques bouillantes. Nous avons réuni plusieurs fractions analogues qui présentent des activités hapténiques **H** de 1/300 à 1/500 ; elles possèdent la composition moyenne suivante :

Phosphore : 1,8 p. 100 - Azote : 0,1 p. 100

Glucides : 9 p. 100

Par des fractionnements systématiques, nous avons cherché à obtenir une fraction très peu soluble dans l'alcool méthylique chaud et dans l'acide acétique glacial, riche en glucides, pauvre en phosphore et aussi peu active que possible (c'est-à-dire une fraction présentant l'ensemble des propriétés des fractions moins solubles dans l'alcool méthylique et dans l'acide acétique glacial que les préparations où se concentre l'haptène).

Nous avons soumis l'ensemble des fractions précédentes à trois nouveaux fractionnements : précipitation de la solution chloroformique par l'alcool méthylique, dissolution dans l'alcool méthylique bouillant suivie d'une précipitation fractionnée

après concentration progressive, précipitation de la solution chloroformique par l'acide acétique glacial, puis l'acétone ⁽¹⁰⁾. Malgré ce triple fractionnement, nous n'avons pas réussi à abaisser l'activité hapténique des fractions peu solubles dans l'alcool méthylique et dans l'acide acétique glacial au-dessous de 1/200.

On purifie la fraction la moins active par précipitation de son émulsion aqueuse par l'alcool à 50 c. et le chlorure de sodium. Puis, enfin, on soumet le précipité précédent à une extraction énergique par de l'acétone bouillante qui d'ailleurs n'enlève que des traces infimes de « substances cireuses ».

On obtient finalement une fraction [39] pesant 1,36 g. Son activité hapténique est encore notable : $H = 1/200$; cependant elle est environ 20 fois plus faible que celle des fractions les plus actives. Elle possède la composition suivante :

Phosphore : 1,45 p. 100 - Azote : 0,03 p. 100

Glucides : 16,7 p. 100

La teneur, relativement faible d'ailleurs, en phosphore ne s'accompagne que d'une trace absolument négligeable d'azote ; il faut donc supposer que *cette fraction contient également des acides phosphatidiques*. Malgré sa teneur élevée en glucides, cette préparation est parfaitement soluble dans le chloroforme et dans l'éther. On ne peut pas expliquer la présence d'une quantité aussi importante de glucides par un simple phénomène de solvation ; il faut donc conclure que *les glucides sont inclus dans des molécules lipidiques*.

Cette fraction, après évaporation de sa solution chloroformique, se présente sous la forme d'une masse incolore qui, sans être franchement molle, n'est pas dure et cassante comme les fractions les plus actives et les fractions inactives très solubles dans l'alcool méthylique froid. Elle se dissout mal dans l'eau froide, mais elle se gonfle rapidement dans l'eau bouillante où elle donne une émulsion un peu visqueuse et très trouble, mais très stable même après refroidissement. La turpitude de ces émulsions est très probablement due à la présence de substances insolubles dans l'eau ; ces substances insolubles dans l'eau seraient maintenues en émulsion grâce à la présence d'autres substances donnant une solution visqueuse dans l'eau, ce qui rend impossible une séparation par centrifugation ou par filtration.

(10) Au cours du fractionnement par le chloroforme et l'alcool méthylique, il se sépare une fraction intermédiaire peu active ($H = 1/100$), pauvre en phosphore (1,4 p. 100) et pauvre en glucides (1,5 p. 100) ; ce fait montre que l'ensemble des substances peu solubles dans l'alcool méthylique chaud est constitué par un mélange complexe de lipides.

RESUME ET CONCLUSIONS DU CHAPITRE II

Nous avons obtenu l'haptène lipoidique contenu dans les « Bacilles de la Tuberculine » sous la forme d'une préparation soluble dans l'éther et insoluble dans l'acétone bouillante. Cette préparation est constituée par un mélange très complexe de lipides très difficiles à séparer.

Nous avons tout d'abord tenté d'en isoler la molécule de l'haptène lipoidique.

L'haptène lipoidique est rapidement détruit par les réactifs acides ou alcalins même à froid ; donc, seul l'emploi de solvants neutres permet de fractionner les préparations actives sans détruire l'haptène. Mais dans ces conditions, la séparation des constituants du mélange lipidique ne se fait que très lentement, d'une manière incomplète et avec de très mauvais rendements, car les phénomènes de solvation sont intenses. Grâce à des fractionnements nombreux et systématiques, nous avons pu cependant concentrer l'haptène dans des fractions de plus en plus actives. Nous avons employé avec succès les procédés suivants :

- Précipitation de la solution chloroformique par l'alcool méthylique à + 4°.
- Dissolution dans l'alcool méthylique bouillant suivie d'une précipitation fractionnée, après refroidissement, puis de concentrations successives de la solution méthylique.
- Précipitations successives et répétées de la solution aqueuse par l'alcool à 50 c., puis le chlorure de sodium.
- Dissolution dans la pyridine chaude suivie d'une précipitation par refroidissement.
- Dissolution dans l'acide acétique glacial (anhydre) suivie d'une précipitation par l'acétone.

Les multiples fractionnements effectués à l'aide de ces diverses méthodes permettent d'obtenir des fractions qui possèdent un pouvoir hapténique extrêmement élevé, mais qui sont encore constituées par un mélange de lipides phosphorés, que nous ne sommes pas parvenue à séparer.

Au cours des divers fractionnements, nous avons vu les fractions les plus riches en haptène se séparer lentement et progressivement d'avec deux autres types de fractions moins actives.

Les unes sont plus solubles dans l'alcool méthylique et l'acide acétique glacial que les fractions les plus actives ; elles sont également plus riches en phosphore et en azote, mais plus pauvres en glucides. Les autres, au contraire, sont moins solubles dans l'alcool méthylique et dans l'acide acétique glacial que les fractions plus actives ; elles sont plus pauvres en phosphore, elles ne contiennent plus que des traces d'azote, mais elles sont plus riches en glucides.

Seul le test biologique nous a permis de différencier les fractions les plus riches en haptène d'avec les deux autres types de fractions. Les fractions les plus actives apparaissent tant par leurs propriétés physiques que par leur composition chimique, comme un mélange des deux autres fractions moins actives, une portion intermédiaire non individualisée et non comme une molécule définie. Malgré de multiples tentatives, nous n'avons pas réussi à résoudre le mélange dans lequel l'haptène se concentre. C'est pourquoi nous avons entrepris l'étude des deux types de fractions moins actives, afin de connaître au moins une partie des impuretés qui accompagnent l'haptène dans les fractions les plus actives. Connaissant alors la nature de ces impuretés, nous pouvions espérer trouver plus facilement un moyen de les séparer d'avec l'haptène.

Par de nouveaux fractionnements systématiques, effectués par des procédés semblables aux précédents, nous avons cherché à éliminer le plus possible l'haptène contenu dans ces deux types de fractions moins actives.

Nous avons finalement ainsi obtenu à partir du mélange des lipides solubles dans l'éther et insolubles dans l'acétone bouillante trois types de fractions :

Fractions les plus actives

Leur activité hapténique est considérable : $H = 1/4.500$ ($0,25 \text{ cm}^3$ d'une solution contenant par cm^3 $\frac{1 \text{ mg}}{4 \cdot 500}$ fixe encore complètement 2,5 doses minima d'alexine en présence de sérum antituberculeux).

Après évaporation de leur solution chloroformique, elles se présentent sous la forme d'une masse amorphe vitreuse, dure et cassante, presque incolore à peine teintée de jaune très pâle.

Elles sont très solubles dans l'éther et le chloroforme, assez solubles dans l'acide acétique glacial, peu solubles dans l'alcool méthylique chaud et insolubles dans ce solvant à froid. Elles donnent avec l'eau des solutions très visqueuses, incolores, parfaitement limpides et optiquement vides à l'ultra-microscope.

Ces fractions possèdent une très grande affinité pour l'eau. Lorsque l'on agite leurs solutions éthérées avec de l'eau, une forte proportion de la substance passe dans la phase aqueuse, même en présence d'acide sulfurique N/10.

L'activité hapténique résiste très bien à l'action de la chaleur (120°) en milieu neutre, mais elle est rapidement détruite par les acides et les alcalis même à froid.

Ces préparations si actives comme haptène de fixation de l'alexine sont dénuées de toute activité antigénique in vivo et elles sont totalement inactives comme haptène de précipitation. Elles contiennent donc un haptène stricte de déviation.

Ces fractions libèrent par hydrolyse acide une quantité importante d'acides gras (de 55 à 60 p. 100) et une petite quantité d'oses (de 4 à 8 p. 100). Dans les fractions actives, les oses sont à l'état d'osides non réducteurs, inclus dans des molécules lipidiques.

Ces préparations sont phosphorées (3 p. 100 environ), mais elles ne contiennent que très peu d'azote (0,1 p. 100 environ) et ne renferment pas trace de soufre. Elles possèdent des cations : sodium, calcium et magnésium.

Exemple : Composition de la fraction [36] :

Phosphore : 2,82 p. 100 - Azote : 0,13 p. 100 - Soufre : néant

Glucides : 5,95 p. 100 - Acides gras : 56 p. 100

Tant par leurs propriétés que par leur composition, ces fractions les plus actives semblent donc être constituées au moins partiellement par les sels de sodium, de calcium et de magnésium d'acides phosphatidiques.

Fractions inactives

très solubles dans l'alcool méthylique froid

Elles ne renferment que des traces d'haptène ($H < 1/10$), elles sont donc plus de 400 fois moins actives que les fractions les plus actives.

Après évaporation de leur solution chloroformique, elles se présentent sous la forme d'une masse amorphe vitreuse, dure et

cassante, colorée en brun jaune orange. Elles sont très solubles dans l'éther, le chloroforme, l'acide acétique glacial et l'alcool méthylique froid. Elles donnent avec l'eau des solutions visqueuses et limpides.

Elles possèdent une très grande affinité pour l'eau. Lorsqu'on agite leur solution aqueuse avec de l'éther une partie seulement de la fraction passe dans la phase étherée ; mais si l'on acidifie la phase aqueuse, la totalité de la fraction se dissout dans l'éther.

Ces fractions sont riches en phosphore (4,5 p. 100 environ). L'azote contenu dans le mélange initial des lipides solubles dans l'éther et insolubles dans l'acétone bouillante se concentre dans ces fractions qui en renferment environ 0,7 p. 100. Ces fractions sont pratiquement dépourvues d'osides (< 1 p. 100). Elles possèdent une grande quantité d'acides gras (de 65 à 70 p. 100).

Exemple : Fraction [38] :

Phosphore : 4,3 p. 100 - Azote : 0,67 p. 100 - Glucides : 0,4 p. 100
Acides gras : 66 p. 100

Ces fractions sont constituées par des sels d'acides phosphatidiques souillés par une petite quantité de lipides azotés.

Les acides phosphatidiques libérés de leurs sels se présentent sous la forme d'une masse pâteuse presque liquide, très soluble dans l'acétone froide, mais insoluble dans l'eau.

Les lipides azotés renferment également du phosphore. Ils sont solubles dans le chloroforme, l'alcool et l'eau, mais insolubles dans l'éther. Ils ne contiennent pas de choline. Ils ne représentent ici qu'une impureté entraînée par solvation.

Les « Bacilles de la Tuberculine » ne contiennent pas de lécitine.

Fractions peu actives

très peu solubles dans l'alcool méthylique bouillant

Il est très difficile d'en éliminer la totalité de l'haptène. Leur activité hapténique est cependant plus de 20 fois plus faible que celle des fractions les plus actives ($H = 1/200$).

Après évaporation de leur solution chloroformique, elles se présentent sous la forme d'une masse amorphe blanchâtre qui, sans être molle, n'est pas dure et cassante comme les deux autres types de fractions. Elles sont très solubles dans l'éther et le chloroforme, très peu solubles dans l'alcool méthylique bouil-

lant, insolubles dans l'alcool méthylique froid et dans l'acide acétique glacial. Elles donnent avec l'eau des émulsions un peu visqueuses et très troubles.

Ces fractions sont relativement pauvres en phosphore (de 1,8 à 1,5 p. 100) ; elles ne renferment plus que des traces d'azote ($< 0,05$ p. 100), mais elles sont riches en glucides (de 12 à 17 p. 100). Elles libèrent des acides gras par hydrolyse.

Exemple : fraction [39] :

Phosphore : 1,45 p. 100 - Azote : 0,03 p. 100

Glucides : 16,7 p. 100

Ces fractions doivent contenir également des sels d'acides phosphatidiques.

Les glucides qu'elles contiennent sont inclus dans des molécules lipidiques.

On voit donc que les fractions les plus solubles et les fractions les moins solubles possèdent des propriétés et des compositions nettement différentes. Par contre, les différences observées entre les fractions les plus actives d'une part, et les deux types de fractions inactives d'autre part, sont beaucoup moins grandes, elles sont seulement d'ordre quantitatif. Dans le mélange initial des lipides solubles dans l'éther et insolubles dans l'acétone bouillante, ces faibles différences de solubilité sont, de plus, atténuées par des phénomènes de solvatations réciproques. C'est pourquoi il est si difficile de séparer les fractions les plus actives d'avec les lipides qui les accompagnent dans la préparation initiale.

Les trois types de fractions contiennent toutes des sels d'acides phosphatidiques. En dépit de plusieurs tentatives, nous ne sommes pas parvenue à isoler l'acide phosphatidique contenu dans les fractions les plus actives sans détruire partiellement l'haptène. Nous ne pouvons donc pas affirmer que l'activité hapténique est liée à une molécule phosphatidique ou, au contraire, à une autre substance que les fractions les plus actives peuvent également contenir.

Les fractions les plus actives renferment encore une petite quantité de glucides que nous n'avons pas réussi à éliminer, car ils sont inclus dans des molécules lipidiques. Nous ne pouvons donc pas affirmer que le groupement spécifique de l'haptène n'est pas de nature osidique.

Nous pouvons cependant conclure à la suite de cette étude que :

1° L'haptène lipoïdique est très vraisemblablement de nature lipidique, car il accompagne toujours les fractions lipidiques au cours des multiples fractionnements que nous avons effectués.

2° L'haptène lipoïdique n'est probablement pas azoté, car les fractions les plus actives ne contiennent plus que 0,1 p. 100 d'azote.

3° Si des oses entrent dans la constitution de la molécule de l'haptène lipoïdique, la totalité des oses liés aux lipides éthéro-solubles et insolubles dans l'acétone ne détermine pas l'activité hapténique, car les fractions peu actives les moins solubles dans l'alcool méthylique sont les plus riches en glucides.

Les fractions les plus actives paraissent donc constituées, au moins partiellement, par un mélange des deux types de fractions inactives. Ne parvenant plus à fractionner les fractions les plus actives, nous avons alors entrepris l'étude chimique comparative des trois types de fractions, espérant ainsi découvrir par différence la molécule de l'haptène dans les fractions les plus actives.

CHAPITRE III

ETUDE CHIMIQUE DES TROIS TYPES DE FRACTIONS SÉPARÉES DES LIPIDES SOLUBLES DANS L'ÉTHÉR ET INSOLUBLES DANS L'ACETONE BOUILLANTE

PLAN DU CHAPITRE III

ANALYSE MINÉRALE	
HYDROLYSE BARYTIQUE	
Etudes préliminaires effectuées avec des fractions très actives.	
Hydrolyses barytiques comparatives des trois types de fractions.	
Fractions hydrosolubles des hydrolysats barytiques	
I. de la fraction la plus active [A]	
II. de la fraction Inactive la plus soluble [Ip]	
III. de la fraction Inactive la moins soluble [Im]	
Comparaison des fractions hydrosolubles des hydrolysats des trois fractions [A], [Ip] et [Im]	
Etude des acides gras des trois fractions	
Conclusions de l'étude comparative de la constitution chimique des trois fractions	
HYDROLYSE SULFURIQUE A FROID d'une fraction très active.	
Discussion et essais d'interprétation de certains résultats obtenus dans les hydrolyses barytiques des diverses fractions lipidiques et de l'hydrolyse sulfurique à froid	
RESUME ET CONCLUSIONS du Chapitre III	

Pour effectuer l'étude chimique comparative des trois types de fractions que nous avons séparées à partir de la fraction lipidique soluble dans l'éther et insoluble dans l'acétone bouillante, nous avons utilisé trois fractions isolées d'un même extrait alcoolique de bacilles. Nous désignons ces trois fractions par les abréviations suivantes :

- [A] : fraction la plus Active (fraction [36] page 128)
[Ip] : fraction Inactive la Plus
soluble (fraction [38] page 145)
[Im] : Fraction Inactive la Moins
soluble (fraction [39] page 147)
-

ANALYSE MINÉRALE

Nous avons conclu, à la fin du chapitre précédent, que les trois types de fractions que nous avons séparées contiennent toutes des sels d'acides phosphatidiques. Nous avons tout d'abord cherché si la nature des cations saturant ces acides phosphatidiques pouvait expliquer les différences de solubilité de leurs sels. En effet, on conçoit aisément que les divers sels d'un même acide phosphatidique puissent posséder des solubilités différentes.

Nous avons effectué cette étude comparative avec les trois fractions séparées d'un même extrait alcoolique : la plus active **[A]**, l'inactive la plus soluble **[Ip]** et l'inactive la moins soluble **[Im]**.

Afin de débarrasser ces fractions de toute impureté minérale, on soumet leur solution aqueuse à une dialyse dans des sacs de collodion pendant trois jours vis-à-vis d'eau distillée renouvelée une dizaine fois.

La calcination de ces solutions dans des capsules de silice donne les poids de cendres suivants :

FRACTIONS	Cendres p. 100 de substances dialysées	Phosphore p. 100 de substances dialysées	Phosphore p. 100 de cendres
Inactive la plus soluble [Ip] .	12,9	4,15	33
La plus active [A]	7,6	2,51	32
Inactive la moins soluble [Im]	4,3	1,40	32,5

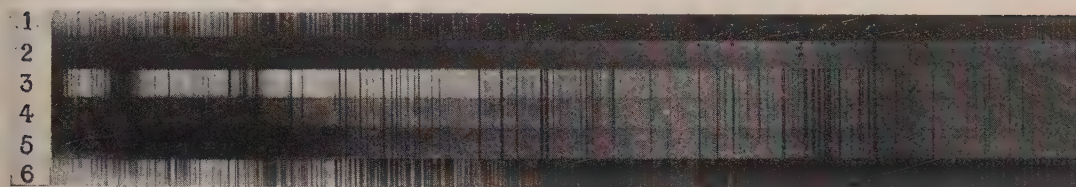
On constate donc que les teneurs en cendres sont très différentes ; mais par contre elles sont sensiblement proportionnelles aux teneurs en phosphore (autrement dit, les cendres renferment le même pourcentage de phosphore).

Comme précédemment (page 131), on réalise l'analyse complète et comparative des cations contenus dans ces cendres à l'aide d'une méthode spectrographique. On transforme les cendres en chlorures pour les rendre plus volatiles, puis on enregistre sur un même cliché les spectres d'arc des cendres provenant des trois fractions. Dans ces trois spectres on caractérise du sodium, du calcium et du magnésium par leurs raies principales sans qu'il soit possible de noter dans l'une quelconque des fractions une nette prédominance de l'un de ces éléments. Un tel procédé ne peut, naturellement, donner que des renseignements grossièrement quantitatifs. Cependant, l'aspect identique des trois spectres inscrits côte à côte permet de conclure à la similitude des compositions minérales des trois fractions comparées.

Il est également intéressant de remarquer que l'on retrouve dans ces trois fractions qui ont été en contacts prolongés et répétés avec des solutions concentrées de chlorure de sodium, la même composition minérale que dans la préparation que nous avons étudiée plus haut (page 131) et qui n'avait pas été traitée par le chlorure de sodium. La loi d'action de masse n'a pas joué avec ces substances qui, nous l'avons déjà vu, ne réagissent que très lentement.

Donc la nature des cations saturants les acides phosphatidiques ne peut pas expliquer les solubilités, ni les activités sérologiques différentes des sels contenues dans les trois fractions comparées.

**Analyse spectrale comparative
des cendres des trois fractions [A], [I p.] et [Im]**



Spectres d'arc

- 1 et 6 Spectres du fer (*spectres de référence*).
- 2 Spectre des électrodes de carbone.
- 3 Spectre des cendres de [Ip].
- 4 Spectre des cendres de [Im].
- 5 Spectre des cendres de [A].

HYDROLYSE BARYTIQUE

Avant d'exposer en détail l'étude comparative des produits d'hydrolyse des trois fractions séparées d'un même extrait alcoolique ([Ip], [A] et [Im]), nous indiquerons les premiers résultats que l'hydrolyse de deux autres préparations très actives nous avait fournis.

Dès l'abord, la constitution chimique de ces fractions hapténiques purifiées s'est révélée très complexe. Associée aux conclusions du chapitre précédent, cette complexité traduit l'hétérogénéité de ces préparations et nous a incité plus particulièrement à faire cette étude comparative tant pour connaître les phosphatides du *Bacille tuberculeux*, que pour essayer d'y découvrir la molécule de l'haptène lipoïdique.

ETUDES PRELIMINAIRES EFFECTUEES AVEC DES FRACTIONS TRES ACTIVES

Nous avons décomposé nos préparations par une hydrolyse barytique au bain-marie bouillant. Ce procédé permet de séparer les acides gras sans libérer les fonctions réductrices des oses qui sont tous à l'état d'osides non réducteurs dans nos préparations, et sans libérer de quantité trop importante d'acide phosphorique minéral ; de plus la baryte est facile à éliminer quantitativement à l'état de sulfate ou de carbonate.

Dans une premier essai effectué avec la préparation [35] $H = 1/4.500$ (page 123), nous avons constaté que l'hydrolyse barytique libère d'une part des acides gras qui se séparent sous la forme de savons de baryum insolubles dans l'eau, d'autre part des substances hydrosolubles renfermant du phosphore, des osides non réducteurs, de l'inositol et une petite quantité de glycérol difficile à caractériser dans ce mélange.

Dans un deuxième essai, nous avons cherché à connaître les liaisons que ces divers constituants peuvent présenter entre eux et en particulier à quelle molécule est liée le phosphore. Pour effectuer cette étude, nous avons utilisé une fraction [40] qui possède une activité hapténique très élevée : $H = 1/3.000$ à $1/4.000$; elle contient 2,44 p. 100 de phosphore et 9,3 p. 100 de glucides. (Cette fraction est analogue à la fraction [D₃] du tableau V, page 117).

L'Hydrolyse barytique

(Les opérations suivantes sont schématisées dans le tableau VIII, page 161) :

Technique : On dissout 600 mg. de la fraction [40] dans 30 cm³ d'eau, puis on ajoute 20 cm³ d'une solution contenant 600 mg. d'hydrate de baryum. Il se forme un précipité blanc abondant et lourd. On chauffe le précipité et la solution dans un bain-marie bouillant pendant une heure.

Fraction de l'hydrolysate barytique insoluble dans l'eau

Cette fraction est à peu près uniquement constituée par des savons de baryum et par une petite quantité de phosphate de baryum. On lave soigneusement cette fraction avec de l'eau, puis on la met en suspension dans de l'éther que l'on agite avec de l'acide chlorhydrique à 10 p. 100, afin de libérer les acides gras. La phase étherée lavée jusqu'à réaction neutre des eaux de lavage, donne par évaporation 325 mg. d'acides gras (soit 55 p. 100 de la fraction [40]). La phase eau chlorhydrique renferme 2 mg. de phosphore à l'état d'acide phosphorique minéral. Ces 2 mg. de phosphore ne représentent que 13 p. 100 du phosphore contenu dans les 600 mg. de la fraction hydrolysée ; l'action de la baryte n'a donc pas libéré une trop grosse quantité d'acide phosphorique minéral.

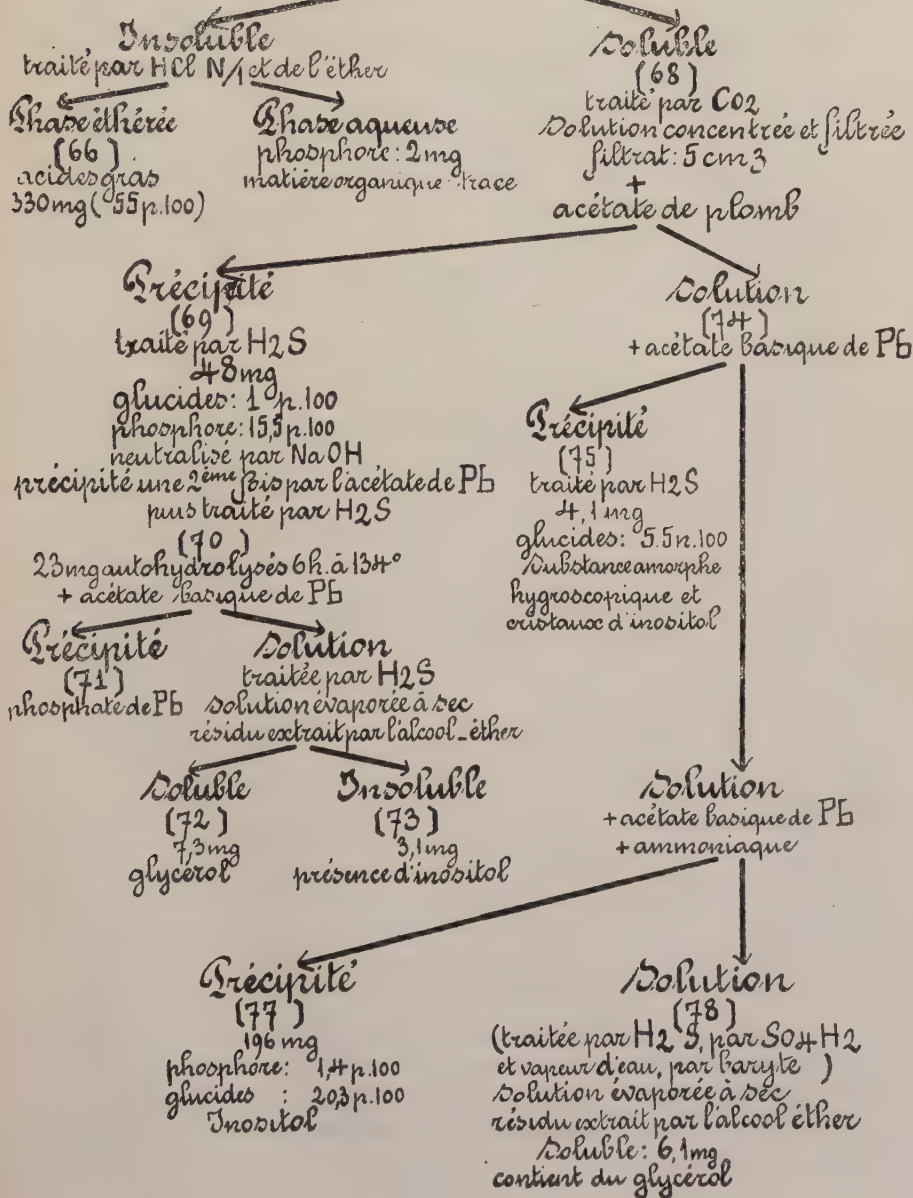
Fraction de l'hydrolysate barytique soluble dans l'eau

On rassemble le filtrat et les eaux de lavage des savons de baryum et du phosphate de baryum. On précipite l'excès de baryte par un courant de gaz carbonique dont on chasse l'excès à l'ébullition sous le vide, afin de décomposer le bicarbonate de baryum beaucoup plus soluble que le carbonate. On filtre le car-

Tableau VIII

Hydrolyse barytique d'une fraction tréactive (40)

600 mg de (40) dissous dans 50 cm³ d'eau + 600 mg de baryte hydratée
(Saint-Marie bouillant 1 heure)



bonate de baryum, puis on concentre le filtrat jusqu'à sirop. On filtre à nouveau le sirop pour éliminer une très petite quantité de carbonate de baryum qui a cristallisé pendant la concentration.

1° SÉPARATION DES ACIDES ORGANOPHOSPHORIQUES PRÉCIPITABLES PAR L'ACÉTATE NEUTRE DE PLOMB.

Afin de séparer les acides organophosphoriques (du type acide glycérophosphorique), on ajoute aux 5 cm³ de filtrat, une solution saturée d'acétate neutre de plomb, goutte à goutte, jusqu'à cessation de la précipitation. Après avoir lavé le précipité trois fois avec de petites quantités d'eau, on le met en suspension dans de l'eau. On décompose alors les sels de plomb par un courant d'hydrogène sulfuré qui précipite du sulfure de plomb et libère les acides organophosphoriques hydrosolubles. On sépare le sulfure de plomb, puis on le lave trois fois avec de l'eau saturée d'hydrogène sulfuré. Le filtrat et les eaux de lavage réunis laissent par évaporation un résidu sirupeux, incolore, très hygroscopique et fortement acide au tournesol. Ce sirop [69] est très riche en phosphore (15,5 p. 100), il ne renferme que des traces de glucides (1 p. 100, dosés après hydrolyse sulfurique à 120°). La neutralisation de cette fraction acide par de la soude tirée, en présence de phtaléine, montre que chaque atome de phosphore possède deux fonctions acides libres. Pour poursuivre la purification, les sels de sodium obtenus par neutralisation au moyen de soude, sont soumis à une deuxième précipitation à l'état de sel de plomb dont on libère à nouveau les acides organophosphoriques [70], par de l'hydrogène sulfuré. (Il est nécessaire de précipiter les sels de plomb en milieu neutre, car ils sont beaucoup plus solubles en milieu acide).

Afin d'étudier la composition de ces acides organo-phosphoriques, nous avons cherché à libérer par hydrolyse les alcools qui estérifient l'acide phosphorique.

a) *Hydrolyse des acides organophosphoriques : Nature des alcools liés à l'acide phosphorique.*

Un grand nombre des esters polyolphosphoriques connus (glycéro, hexose, inosito... etc., phosphoriques) sont extrêmement résistants à l'hydrolyse tant en milieu acide qu'en milieu alcalin. Pour libérer la totalité de l'alcool, il est nécessaire d'opérer à des températures élevées.

Posternak (148) a utilisé avec succès, pour décomposer l'acide inosito-tétraphosphorique, une technique très simple qui consiste à chauffer la solution aqueuse de l'acide libre à l'autoclave à 130° pendant 6 heures. En effet, c'est l'autohydrolyse qui donne les meilleurs résultats avec les esters de ce type ; la présence d'acide sulfurique gêne la décomposition. Robinson (151) a observé que l'autohydrolyse de l'acide glucose-6-phosphorique est plus rapide que l'hydrolyse en présence d'acide sulfurique N/10 qui elle-même est plus rapide que l'hydrolyse en présence d'acide sulfurique N/1. Dans tout notre travail nous avons utilisé avec succès la technique de Posternak : chauffage de l'acide libre en solution aqueuse à l'autoclave à 130° pendant 6 heures que nous avons converti en un chauffage à 150° pendant 2 heures, lorsque nous avons pu disposer d'un autoclave pour hautes pressions.

On soumet à ce traitement les acides organophosphoriques purifiés [70] (23 mg.). Dans l'autohydrolysats, on précipite l'acide phosphorique libre et la petite quantité d'acides organophosphoriques qui peut y rester, à l'état de sel de plomb [71] (on emploie comme réactif non de l'acétate neutre de plomb, mais de l'acétate basique de façon à neutraliser les acidités libres).

La solution mère du précipité plombique contient les alcools qui estérifiaient primitivement l'acide phosphorique. Après avoir éliminé l'excès de plomb par de l'hydrogène sulfuré, on évapore la solution à sec ; il reste un résidu sirupeux (11,5 mg.). L'aspect de ce résidu permet de supposer qu'il contient du glycérol. Afin de séparer le glycérol, on extrait le résidu par un mélange en volumes égaux d'alcool et d'éther.

La solution alcool-éthérée laisse par évaporation une masse sirupeuse [72] pesant 7,3 mg., qui, après oxydation par l'eau de brome, donne avec de la codéine et de l'acide sulfurique concentré, une coloration vert canard (réaction de Denigès), dont la teinte est sensiblement identique et l'intensité à peine inférieure à celle donnée par un témoin contenant le même poids de glycérol pur.

Cette fraction [72] est donc constituée par du glycérol.

L'alcool-éther qui a extrait le glycérol laisse insoluble un résidu solide presque entièrement soluble dans l'eau : fraction [73] (soluble dans l'eau : 3.1 mg.). Quelle peut être la nature de cette substance ? La fraction [69] (acides organophosphoriques préci-

pités par l'acétate neutre de plomb) ne contenait pratiquement pas de glucides; nous avons alors recherché la présence d'inositol. La réaction de Scherer qui caractérise l'inositol est en effet nettement positive. *La fraction [73] contient donc de l'inositol.*

b) *Constitution des acides organophosphoriques précipitables par l'acétate neutre de plomb.*

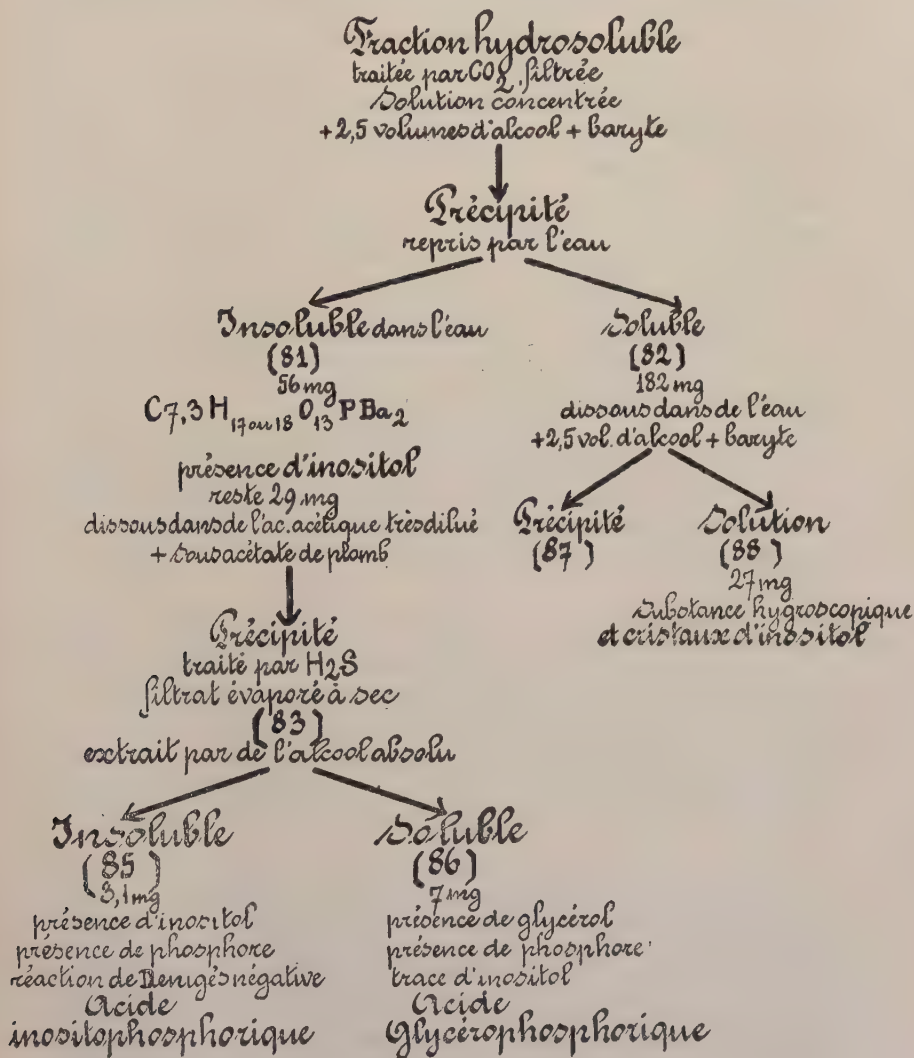
On a donc un mélange de glycérol et d'inositol qui, avant l'autohydrolyse à 134°, étaient liés à de l'acide phosphorique. Il restait à préciser si ces trois constituants formaient primitivement une seule molécule, ou si, au contraire, ils formaient un mélange d'acide glycérophosphorique et d'acide inositolphosphorique.

Pour résoudre ce problème nous avons fait appel aux produits de la première hydrolyse barytique que nous avons effectuée avec la fraction [35] (page 123) (voir tableau IX, page 165). En cherchant à purifier les sels de baryum des acides organophosphoriques par précipitation par de l'alcool en présence d'un excès de baryte à partir de leur solution aqueuse, nous avons obtenu un composé insoluble dans l'eau et microcristallin [81] (il provoque des phénomènes de polarisation chromatique et rétablit sa lumière polarisée entre deux nicols croisés). Ce produit possède la composition suivante : phosphore : 5,06 p. 100, baryum : 44,09 p. 100, carbone : 14,23 p. 100, hydrogène : 2,86 p. 100), il répond donc à la formule $C_{7,3}H_{17}O_{18}O_{13}P_{Ba_2}$. Il donne une réaction de Scherer très nettement positive. Anderson (2), en étudiant les esters inositolphosphoriques contenus dans le son de blé, a également décrit la formation d'un sel de baryum qui, bien que cristallisé, n'a pas une composition constante suivant les préparations. Notre composé semble donc être un sel basique de baryum impur d'un ester inositolophosphorique contenant deux molécules d'eau de cristallisation.

En réalité, ce sel ne contient qu'une petite quantité d'acide inositolphosphorique et quoique cristallisé, il est constitué par un mélange. Pour purifier ce sel basique insoluble dans l'eau, on le dissout dans une petite quantité d'acide acétique très dilué, puis on précipite les acides organophosphoriques par du sous-acétate de plomb. Après avoir décomposé les sels de plomb par de l'hydrogène sulfuré, on évapore à sec la solution qui contient les acides organophosphoriques libres [83]. L'aspect sirupeux du résidu d'évaporation permet de supposer qu'il contient de l'acide glycérophosphorique.

Tableau IX

Hydrolyse barytique d'une fraction très active (35)



Tandis que l'acide glycérophosphorique est soluble dans l'alcool, l'acide inositolphosphorique est insoluble dans ce solvant (Anderson) (2). Nous avons donc utilisé cette différence de solubilité pour extraire séparément l'acide glycérophosphorique que peut contenir le résidu d'évaporation [83]. Nous avons alors constaté avec surprise que la majeure partie des acides organophosphoriques est soluble dans l'alcool: fraction [86]. Elle pèse 7 mg. tandis que le résidu insoluble [85] pèse seulement 3,1 mg. La fraction [86] soluble dans l'alcool est bien constituée par de l'*acide glycérophosphorique*, car elle contient du phosphore et la réaction de Denigès est positive (elle ne renferme que des traces d'inositol). Le résidu insoluble dans l'alcool [85] est soluble dans l'eau. Il paraît bien être constitué par de l'acide inositolphosphorique, car il contient du phosphore, donne une réaction de Scherer positive et une réaction de Denigès négative (coloration rose mauve au lieu de vert canard).

Le sel basique de baryum, quoique cristallisé, était donc constitué par un mélange (et non une combinaison) d'acide glycérophosphorique et d'acide inositolphosphorique ⁽¹⁾.

Dans les fractions actives [40] et [35], avant l'hydrolyse barytique, ces acides organophosphoriques étaient estérifiés par des acides gras; il semble donc logique de conclure que *les fractions actives contiennent un mélange d'acides glycérophosphatidiques et inositolphosphatidiques* ⁽²⁾.

2° PRÉCIPITATION PAR LE SOUS-ACÉTATE DE PLOMB

Après avoir identifié les acides organophosphoriques précipités par l'acétate neutre de plomb, nous avons poursuivi l'étude de leur solution mère (voir tableau VIII, page 161).

Lorsque l'on ajoute quelques gouttes de sous-acétate de plomb à cette solution mère, il se forme un précipité peu abondant. Après élimination du plomb par de l'hydrogène sulfuré, on ob-

(1) Les esters phosphoriques ont, en effet, une grande tendance à donner des sels doubles cristallisés qui ne sont cependant que des mélanges. Posternak (148), par exemple, décrit un sel de calcium cristallisé qui est un mélange des acides inositolhexaphosphorique et inositoltétraphosphorique. A partir des produits résultants de l'action du suc de levure sur le mélange de glucose et de phosphate de calcium, Smythe (173) isole un sel cristallisé qui est un mélange équimoléculaire de glycéromonophosphate et de glucosemonophosphate. Cet auteur obtient également ce sel de calcium cristallisé à partir d'un simple mélange en proportions quelconques de glucosemonophosphate de calcium et de glycéromonophosphate de calcium.

(2) Ces conclusions ont déjà fait l'objet d'une note préliminaire (115).

tient une fraction [75] qui pèse seulement 4,1 mg. Elle est constituée par une substance amorphe hygroscopique dans laquelle sont noyés des cristaux qui présentent la forme cristalline typique des cristaux d'inositol. Cette fraction renferme 5,5 p. 100 de glucides.

3° PRÉCIPITATION PAR LE SOUS-ACÉTATE DE PLOMB ET L'AMMONIAQUE

La solution mère [76] du précipité précédent doit contenir la presque totalité des glucides contenus dans la fraction active [40], de l'inositol (puisque les précipités précédents n'en renferment qu'une petite quantité), du glycérol libre (provenant de l'hydrolyse d'une partie de l'acide glycérophosphorique), et enfin des acétates minéraux. Afin de séparer les glucides et l'inositol d'avec le glycérol libre et les acétates, on précipite les glucides et l'inositol par additions successives de sous-acétate de plomb et d'ammoniaque jusqu'à ce que ni l'un ni l'autre de ces deux réactifs ne produisent plus de précipité ; le précipité est très abondant. Après l'avoir lavé trois fois, on le décompose par de l'hydrogène sulfuré. Le filtrat du sulfure de plomb laisse par évaporation un résidu vitreux amorphe et dur, pesant 186 mg. fraction [77]. Cette fraction contient 20,3 p. 100 de glucides, dont les fonctions réductrices n'apparaissent qu'après hydrolyse sulfurique à 120°, elle renferme une quantité importante d'inositol (réaction de Scherer intense), et fait plus curieux, du phosphore (1,4 p. 100). Ce phosphore n'a pas été précipité ni par l'acétate neutre de plomb, ni par l'acétate basique ; or, les acides organophosphoriques simples (du type acide glycérophosphorique) sont tous précipitables par l'acétate neutre, il faut donc supposer qu'il existe des acides organophosphoriques plus complexes ⁽³⁾.

(3) Hors du Bacille tuberculeux, on a signalé également l'existence d'esters phosphoriques non précipitables par l'acétate neutre de plomb, mais ils sont encore très mal connus.

Posternak (149) isole à partir des amidons des tubercules et de rhizomes des acides polyosemonophosphoriques qui ne précipitent pas par l'acétate neutre de plomb seul, mais qui sont précipitables les uns par le sous-acétate de plomb seul, les autres par le sous-acétate en présence d'ammoniaque. Robinson et Morgan (152) en étudiant les esters phosphoriques de la fermentation alcoolique, constatent qu'une fraction phosphorée n'est pas précipitable par le sous-acétate de plomb ; mais comme il est difficile de séparer les esters phosphoriques contenus dans cette fraction d'avec les substances non phosphorées, ces esters n'ont pas été étudiés.

4° SOLUTION-MÈRE DU PRÉCIPITÉ FORMÉ PAR LE SOUS-ACÉTATE
DE PLOMB ET L'AMMONIAQUE

Nous avons cherché à isoler le glycérol contenu dans cette fraction [78]. Dans ce but, on précipite l'excès de plomb par de l'hydrogène sulfuré. On élimine l'hydrogène sulfuré et l'acide acétique en les entraînant par un courant de vapeur d'eau après avoir acidifié la solution avec de l'acide sulfurique. On ajoute alors un léger excès de baryte qui précipite l'acide sulfurique et libère l'ammoniaque. Enfin on précipite la baryte par du gaz carbonique dont on chasse l'excès par l'ébullition. On évapore la solution à sec, puis on extrait le résidu d'évaporation par de l'alcool éther. La solution alcool-éthérée renferme 6 mg. d'un produit impur qui contient du glycérol (réaction de Denigès positive) ; le glycérol libre correspond à l'acide phosphorique minéral caractérisé dans la fraction insoluble de l'hydrolysât barytique. Il provient donc de l'hydrolyse d'une partie de l'acide glycérophosphorique.

La constitution chimique des fractions actives paraît donc fort complexe et, après ces premières études, de nombreux points restaient à préciser :

La fraction [77] (tableau VIII, page 165) précipitée par le sous-acétate de plomb et l'ammoniaque est-elle constituée par une molécule unique ou par un mélange, comme cela semble plus probable ?

Les oses et l'inositol sont-ils liés pour former un « dimanninose », comme Anderson l'affirme, dans les phosphatides qu'il a étudiés, ou sont-ils indépendants ?

À quels constituants le phosphore est-il directement lié, et pourquoi ne donne-t-il pas un sel de plomb insoluble dans l'eau ?

Nous ne sommes pas parvenue à donner des réponses définitives à toutes ces questions, car nous n'avons pas pu obtenir de composés purs. En effet, ces substances sont difficiles à séparer et, comme nous ne disposions que de quantités très petites de produits, il était matériellement impossible d'entreprendre des fractionnements répétés. Cependant, l'étude directe de la fraction active, et l'étude comparative des trois fractions active et inactives, nous a permis de préciser quelques points intéressants.

Tableau X

Hydrolyse barytique de la fraction la plus active (A)

1 g. de (A) + 100 cm³ de baryte N/10, bain-marie bouillant 1 heure
insoluble + 10 cm³ de baryte N/10, bain-marie bouillant 1 heure



HYDROLYSES BARYTIQUES COMPARATIVES DES TROIS TYPES DE FRACTIONS

Cette étude comparative a été effectuée avec les trois types de fractions séparées à partir d'un même extrait alcoolique. Nous rappelons que nous les désignons par les abréviations suivantes :

[A] : fraction **[36]** la plus Active.

[Ip] : fraction **[38]** Inactive la plus soluble.

[Im] : fraction **[39]** Inactive la moins soluble.

L'hydrolyse des trois fractions a été faite dans des conditions identiques, ainsi que le fractionnement des produits libérés. Nous ne décrirons donc en détail que l'étude de la fraction la plus active : **[A]** et nous donnerons simplement les résultats obtenus dans le cas des deux autres fractions **[Ip]** et **[Im]**.

Hydrolyse barytique de la fraction la plus active **[A]**

Technique de l'hydrolyse : On dissout 1 g. de **[A]** dans 50 cm³ d'eau, on obtient une gelée visqueuse parfaitement limpide et homogène. On la chauffe dans un bain-marie bouillant, puis on ajoute goutte à goutte, en agitant constamment, 50 cm³ d'une solution bouillante de baryte N/5. Les premiers cm³ de baryte ajoutés font apparaître un trouble et disparaître la viscosité ; puis la baryte donne un précipité qui se dépose rapidement. (L'addition de la baryte chaude dans la solution chaude donne un précipité beaucoup plus fin que celui qui se forme lorsque l'on fait ce mélange à froid. Le contact entre la substance est alors bien meilleur dans cette fine poudre que dans les gros grumeaux que l'on obtient à froid).

Afin de libérer la totalité des acides gras sans soumettre les esters phosphoriques solubles dans la baryte N/10 à une action trop prolongée de la baryte chaude, après un séjour d'une heure dans le bain-marie bouillant, on sépare le précipité à la température ordinaire. C'est seulement le précipité que l'on soumet à une deuxième hydrolyse barytique ; on le chauffe à nouveau avec 10 cm³ de baryte N/5 pendant une heure au bain-marie bouillant.

A. — **Fraction insoluble dans l'eau de l'hydrolysate barytique : les savons de baryum.** (Voir tableau X, page 170).

Après refroidissement du deuxième hydrolysate, on filtre le précipité qui est principalement constitué par les savons de baryum des acides gras. On lave d'abord ces savons trois fois sur le filtre ; mais comme le contact est très mauvais, on les met en suspension dans de l'éther qu'on lave deux fois avec de l'eau alcoolisée.

On décompose ces savons de baryum [89] en les agitant trois fois avec de l'acide chlorhydrique N/1 (10 cm³, puis 5 et 5 cm³). Les acides gras sont libérés instantanément et donnent une solution éthérée parfaitement limpide. (On extrait les eaux chlorhydriques trois fois avec des petites quantités d'éther que l'on joint à la première phase éthérée). On lave la solution éthérée des acides gras jusqu'à réaction neutre des eaux de lavage. On filtre alors la solution éthérée, puis on l'évapore à sec. Le résidu d'évaporation repris par de l'éther anhydre donne une solution parfaitement limpide qui, par évaporation, laisse une masse blanche d'acides gras bien cristallisés [90] pesant 536 mg. (soit 53,6 p. 100 de la fraction [A]), nous étudierons plus loin (page 197) ces acides gras comparativement avec ceux des fractions [Ip] et [Im].

B. — **Fraction hydrosoluble de l'hydrolysate barytique.**

On rassemble les solutions barytiques de la première et de la deuxième hydrolyses et les eaux de lavage neutres des savons de baryum. Après avoir précipité la baryte par un courant de gaz carbonique, on chasse l'excès de gaz carbonique par ébullition sous le vide, afin de décomposer le bicarbonate formé. On filtre et lave le précipité de carbonate de baryum, puis on concentre le filtrat jusqu'à obtention d'un sirop que l'on filtre à nouveau pour éliminer une très petite quantité de carbonate de baryum qui s'est déposé pendant la concentration.

On soumet alors cette solution à une précipitation fractionnée par l'acétate neutre de plomb ; puis par l'acétate basique et enfin par l'acétate basique en présence d'ammoniaque.

1° PRÉCIPITATION PAR L'ACÉTATE NEUTRE DE PLOMB : SÉPARATION DES ACIDES ORGANOPHOSPHORIQUES SIMPLÉS.

On ajoute à la solution précédente une solution saturée d'acétate neutre de plomb. Un précipité blanc apparaît ; il se forme

rapidement au début de l'addition d'acétate, puis plus lentement. On laisse au repos pendant trois heures avant de s'assurer qu'une nouvelle goutte de réactif ne donne plus de nouveau précipité. On recueille le précipité par centrifugation, puis on le lave deux fois avec trois fois son volume d'eau additionnée d'une goutte d'acétate de plomb, puis finalement avec de l'eau pure.

On met le sel de plomb en suspension dans de l'eau tiède, puis on le décompose en faisant passer un courant d'hydrogène sulfuré pendant 30 minutes. On sépare alors le sulfure de plomb formé, puis on le lave cinq fois avec de l'eau saturée d'hydrogène sulfuré.

D'après les résultats obtenus antérieurement, on sait que cette solution doit contenir un mélange des acides glycérophosphorique et inositolphosphorique. Afin de séparer ces acides, on évapore la solution à sec, puis on extrait le résidu cinq fois avec de l'alcool absolu. On obtient ainsi deux fractions :

une fraction [94] soluble dans l'alcool : 55 mg.

une fraction [93] insoluble dans l'alcool : 19 mg.

a) *Acides organophosphoriques solubles dans l'alcool*

La fraction [94] se présente sous la forme d'un sirop très acide qui est constitué par de l'acide glycérophosphorique, car il contient du phosphore en abondance et donne une réaction de Denigès intense.

Nous avons alors recherché si cette fraction contient un mélange des deux isomères α et β de l'acide glycérophosphorique. On sait que seul l'acide α glycérophosphorique peut par oxydation donner naissance à la dioxyacétone responsable de la coloration verte obtenue dans la réaction de Denigès. Donc pour mettre en évidence, par cette réaction, la totalité du glycérol contenu dans la fraction [94], il faut d'abord libérer le glycérol par une autohydrolyse de l'acide glycérophosphorique dissous dans de l'eau, par un chauffage à 150° pendant 2 heures. On détermine approximativement ⁽⁴⁾ les proportions d'acides α et β glycérophosphoriques par un dosage colorimétrique comparatif des teintes obtenues en effectuant la réaction de Denigès avec une même solution avant et après autohydrolyse. Dans le cas pré-

(4) Nous n'avons pas cherché à employer une méthode plus précise car d'après Heiduschka et Neumann (71) de l'acide β glycérophosphorique pourrait se former à partir de l'isomère α au cours de l'hydrolyse barytique.

sent, la coloration obtenue avec la solution autohydrolysée étant deux fois plus intense que celle de la solution non hydrolysée, on peut conclure que *les acides organophosphoriques solubles dans l'alcool [94] sont constitués par un mélange en égales parties (environ) d'acides α et β glycérophosphoriques.*

b) *Acides organophosphoriques insolubles dans l'alcool*

La fraction [93] insoluble dans l'alcool se présente sous la forme d'une substance solide soluble dans l'eau. Nous basant sur les résultats obtenus antérieurement, nous pensions que cette fraction était constituée par de l'acide inositophosphorique ; mais en réalité, elle renferme un mélange d'acides organophosphoriques. Afin d'étudier les alcools qui estérifient l'acide phosphorique, on décompose cette fraction par une autohydrolyse de sa solution aqueuse à 150° pendant 2 heures. On précipite alors l'acide phosphorique libéré, en ajoutant un léger excès de sous-acétate de plomb (la solution demeure cependant acide). La solution mère doit contenir les alcools. Après avoir éliminé l'excès de plomb par le l'hydrogène sulfuré, on évapore la solution à sec [96]. Si la fraction [93] insoluble dans l'alcool n'avait été constituée que par de l'acide inositophosphorique, le résidu [96] de la solution précédente ne devrait contenir que de l'inositol ; mais en réalité c'est un mélange complexe. On l'extrait par de l'alcool-éther (1 volume + 1 volume) ; on obtient deux fractions :

fraction [98] soluble dans l'alcool éther : 2,3 mg.

fraction [97] insoluble dans l'alcool éther : 11,3 mg.

Fraction [98] soluble dans l'alcool-éther. — Elle est constituée par une masse sirupeuse et très hygroscopique, farcie de micro-cristaux non hygroscopiques présentant l'aspect cristallographique caractéristique des cristaux d'inositol. La réaction de Denigès donne une coloration verte plus bleue que celle d'un témoin contenant du glycérol pur. Cette teinte bleue est expliquée par la petite quantité d'inositol entraînée par le glycérol. *Cette fraction [98] est donc constituée par du glycérol et une petite quantité d'inositol.*

Fraction [97] insoluble dans l'alcool-éther. — Cette fraction est soluble dans l'eau. Après l'évaporation, puis la dessiccation de sa solution aqueuse, on voit se former des cristaux groupés en étoiles au sein d'une substance dure, amorphe et très hygroscopique.

Lorsque l'on effectue la recherche de l'inositol à l'aide de la réaction de Scherer, on voit apparaître la coloration rouge du rhodizonate de baryum par simple évaporation de l'acide nitrique, avant même d'avoir introduit de l'acétate de baryum. Ce fait montre, en même temps, que cette fraction [97] renferme et de l'inositol et du baryum. On effectue la réaction de Scherer dans des conditions identiques avec des poids égaux de la fraction [97] et d'inositol pur. La fraction donne une coloration nettement moins intense que le témoin; ceci montre également qu'elle n'est pas uniquement constituée par de l'inositol. En plus du baryum, on peut mettre en évidence la présence de phosphore dans la fraction [97] (elle ne renferme pas de plomb et ne contient que des traces négligeables d'oses: 1,3 p. 100). Nous discuterons plus loin (page 182) la nature probable de la *substance hygroscopique phosphorée* qui accompagne les *cristaux d'inositol* dans la fraction [97].

Quoiqu'il en soit, la quantité d'inositol contenue dans la fraction des acides organophosphoriques précipitables par l'acétate neutre de plomb est très faible par rapport à la quantité de glycérol. (Il est cependant intéressant de constater que l'inositol n'est pas accompagné par des oses dans cette fraction).

2° PRÉCIPITATION PAR LE SOUS-ACÉTATE DE PLOMB

Après la séparation du précipité [92] formé par l'addition d'acétate neutre de plomb, on ajoute du sous-acétate de plomb à la solution mère (jointe aux eaux de lavage du précipité) [99]. Il se forme un précipité infime que l'on sépare, puis qu'on lave deux fois avec quelques gouttes d'eau et une goutte de sous-acétate de plomb, puis une fois avec de l'eau pure. On néglige cet infime précipité [100].

3° SÉPARATION DU GLYCÉROL LIBRE

La solution mère [101] du précipité par le sous-acétate de plomb contient du glycérol. Afin de le séparer plus commodément que dans l'essai préliminaire décrit plus haut (page 168), on précipite l'excès de plomb par de l'hydrogène sulfuré, on évapore la solution à sec, puis on l'extrait par de l'alcool-éther. La solution alcool-éthérée [103] ne renferme pas que du glycérol; par évaporation, elle laisse un résidu riche en substances cristallines constituées vraisemblablement par des acétates de baryum et de sodium. La réaction de Denigès donne une coloration dont la teinte est identique à celle donnée par un témoin de glycérol

et dont l'intensité permet d'estimer à 28mg. la quantité de glycérol contenue dans la fraction [103].

4° PRÉCIPITATION PAR LE SOUS-ACÉTATE DE PLOMB ET L'AMMONIAQUE

La fraction insoluble dans l'alcool-éther [102] pèse 359 mg. Elle renferme du phosphore (2,06 p. 100), des glucides et de l'inositol, mais aussi des acétates minéraux. Pour éliminer ces derniers, on dissout les 335 mg. qui restent après les analyses, dans 3 cm³ d'eau, puis on précipite la fraction par du sous-acétate de plomb et de l'ammoniaque, tandis que les acétates minéraux restent en solution. On ajoute alternativement ces deux réactifs, goutte à goutte, jusqu'à ce que ni l'un ni l'autre ne donne plus de précipité après 24 heures de contact. On lave le précipité trois fois avec de l'alcool à 50°⁽⁵⁾ pour enlever l'excès d'ammoniaque qui, avec l'hydrogène sulfuré, donnerait du sulfure d'ammonium ; puis on le laisse pendant 24 heures dans le vide en présence d'anhydride phosphorique pour éliminer les dernières traces d'ammoniaque. On met alors le précipité en suspension dans de l'eau, puis on le décompose par de l'hydrogène sulfuré. On évapore la solution à sec sous le vide en chauffant légèrement pendant 30 minutes pour bien en chasser l'acide acétique dont on élimine les dernières traces en laissant le résidu d'évaporation pendant plusieurs jours dans un vide profond en présence de chaux (cette fraction [104] pèse 270 mg.).

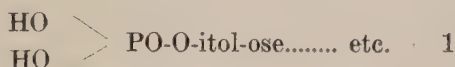
Les osides. — Cette fraction [104] contient 29 p. 100 d'osides dont les fonctions réductrices n'apparaissent qu'après hydrolyse acide. Les réactions de Bertrand (orcinol et acide chlorhydrique concentré) et de Sélivanoff (résorcinol et acide chlorhydrique au 1/2) montrent que *ces osides sont constitués uniquement par des aldohexoses*. Ils ne renferment pas d'acide uronique dont on connaît l'importance en immunologie, car, après action de l' α naph-toré-sorcinol en présence d'acide chlorhydrique au 1/2, on n'obtient pas de coloration violette passant dans l'éther.

Le phosphore. — La fraction [104] contient 2,8 p. 100 de phosphore qui n'est pas précipitable ni par l'acétate neutre de plomb, ni par l'acétate basique, mais seulement par l'acétate

(5) Le précipité étant très soluble dans l'eau, il n'est pas possible de le laver avec de l'eau pure ; c'est pourquoi nous employons de l'alcool à 50°, qui nous a donné de bons résultats.

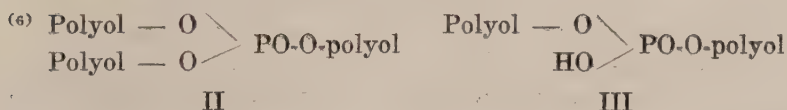
basique en présence d'ammoniaque. Comment peut-on expliquer qu'une aussi grande quantité de phosphore ne précipite pas par l'acétate même basique de plomb ? Plusieurs hypothèses sont possibles :

On peut imaginer l'existence d'un acide polyoside-ortho-phosphorique dont la longue chaîne osidique (pouvant renfermer des oses et des itols) solubiliserait le sel de plomb dans l'eau. Par exemple :



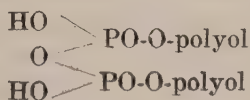
On peut également supposer la présence d'un triester ortho-phosphorique qui ne peut pas donner de sel de plomb (formule II) ou d'un diester orthophosphorique qui, n'ayant qu'une fonction acide libre, donnerait un sel de plomb soluble dans l'eau (formule III).

Exemples :



Enfin il peut exister un ester pyrophosphorique qui, ne possédant également qu'une fonction acide libre par atome de phosphore, pourrait avoir des sels de plomb solubles dans l'eau.

Exemple :



IV

L'une de ces hypothèses n'exclue d'ailleurs pas les autres ; ces différents types d'esters peuvent coexister.

Un titrage des acidités libres que possèdent chaque atome de phosphore peut donc donner des indications intéressantes. Tandis que dans la formule I, chaque phosphore possède deux fonctions acides libres, dans les formules III et IV il n'en possède qu'une et dans la formule II aucune.

(6) Le polyol peut être du glycérol, un itol, ou un oside non réducteur.

Afin de connaître quel type d'ester notre fraction [104] peut contenir, nous avons titré les fonctions acides libres.

Dans ce but, on dissout les 244 mg. qui restent de la fraction [104] dans de l'eau, puis on la neutralise avec 6,08 cm³ de baryte N/20 en présence de phtaléine. Ceci correspond à 0,30 milliéquivalent. On calcule d'après la teneur en phosphore que les 214 mg. de la fraction contiennent 0,21 milliatome de phosphore. On a donc sensiblement *trois fonctions acides libres pour deux atomes de phosphore*. Ces chiffres ne correspondent à aucun des schémas inscrits comme hypothèses simples. Mais la simplicité ne caractérise pas les fractions obtenues dans ce travail, et il faut admettre une fois de plus que l'on a une molécule plus complexe ou un mélange de divers types d'esters. Quoiqu'il en soit, cette fraction ne contient certainement pas des acides glycérophosphoriques ou inositolphosphoriques ou autres du type simple habituel.

Fractionnement de la fraction [104]

(précipitée par le sous-acétate de plomb et l'ammoniaque)

Il est d'ailleurs aisé de mettre en évidence l'hétérogénéité de la fraction [104]. L'addition de deux volumes d'alcool à la solution neutralisée ⁽⁷⁾ de [104] fait apparaître un précipité que l'on sépare et lave deux fois avec des petites quantités d'alcool aux 2/3. L'analyse du précipité [105] pesant 34,5 mg. et de ce qui reste en solution [109] pesant 190 mg. montre clairement que l'on sépare deux fractions très différentes.

Tandis que le précipité [109] est riche en phosphore (5,63 p. 100) et renferme seulement 16 p. 100 de glucides, la solution mère [105] contient seulement 1,9 p. 100 de phosphore, mais elle est riche en glucides 32,5 p. 100). Enfin la réaction de Scherer effectuée avec des poids égaux des deux fractions, donne une coloration et un précipité rouges beaucoup plus importants avec le précipité [105] qu'avec la solution mère [109].

Il est possible qu'en poursuivant systématiquement ces fractionnements, on puisse séparer d'un sel de baryum, très riche en

(7) Il est nécessaire d'effectuer ce fractionnement après neutralisation de la fraction par la baryte, car les sels de baryum des esters phosphoriques sont très peu solubles dans l'alcool même dilué, les acides libres sont beaucoup plus solubles.

Un premier essai effectué avec un fraction analogue ([77] tableau VIII, page 161 non neutralisée, nous a donné deux fractions possédant rigoureusement la même teneur en glucides,

phosphore, une fraction non phosphorée ; mais nous ne disposions que de petites quantités de substances, et il était matériellement impossible d'entreprendre de telles opérations.

On peut cependant conclure que si les oses et l'inositol sont liés sous forme d'osides non réducteurs, ils ne constituent pas une molécule unique, puisque leurs proportions relatives dans les deux fractions sont très différentes.

Hydrolyse des fractions précipitées par le sous-acétate de plomb et l'ammoniaque

Nous avons alors cherché à connaître la nature des acides organophosphoriques simples (du type hexose phosphorique par exemple) qui entrent dans la constitution des esters phosphoriques complexes contenus dans ces fractions.

Nous avons vu (page 163) que l'hydrolyse des acides organophosphoriques est gênée par la présence d'acide sulfurique qui, au contraire, favorise la rupture des liaisons osidiques. Nous avons donc essayé de décomposer partiellement les esters phosphoriques complexes en soumettant les fractions précédentes à une hydrolyse sulfurique.

Essais. — Nous avons effectué un premier essai avec la fraction [77] (tableau VIII, page 161), analogue aux précédentes. (Elle contient 1,4 p. 100 de phosphore non précipitable par l'acétate basique de plomb seul, mais qui précipite par l'acétate basique en présence d'ammoniaque ; elle renferme également de l'inositol et 20,3 p. 100 de glucides non réducteurs). Nous avons constaté qu'un chauffage à 80° pendant 30 minutes, en présence d'acide sulfurique à 5 p. 100, ne libérait que des traces d'acides organophosphoriques précipitables par l'acétate de plomb et seulement des traces infimes d'oses. L'hydrolyse est donc difficile.

Nous avons alors essayé une hydrolyse plus énergique par chauffage à 120° pendant une heure en présence d'acide sulfurique à 5 p. 100. Nous avons effectué ce deuxième essai avec une fraction non précipitable par l'acétate neutre de plomb, qui possède des propriétés et une composition analogue à la précédente (phosphore : 2,67 p. 100, glucides 30 p. 100, Inositol) (cette fraction provient d'une préparation dont nous n'avons pas décrit l'hydrolyse barytique ici). Après l'hydrolyse sulfurique à 120°, nous avons constaté que seulement 2 p. 100 du phosphore contenu dans la fraction est libéré à l'état d'acide phosphorique minéral,

tandis que tout le reste du phosphore se trouve sous la forme d'acides organophosphoriques précipitables par l'acétate neutre de plomb. La technique est donc excellente pour le but que nous nous proposons et nous l'avons appliquée aux fractions [105] et [109] décrites plus haut.

a) *Hydrolyse sulfurique de la fraction [105]*

On dissout les 21 mg. qui restent de cette fraction dans 1,5 cm³ d'acide sulfurique à 5 p. 100, puis on chauffe, pour hydrolyser, pendant une heure à 120°. On précipite l'acide sulfurique à l'état de sulfate de baryum par addition d'un léger excès de baryte que l'on précipite à son tour par du gaz carbonique. On sépare le sulfate et le carbonate de baryum, puis on concentre la solution jusqu'à un petit volume.

L'addition d'acétate neutre de plomb à la solution ne fait apparaître aucun précipité. On élimine le plomb par de l'hydrogène sulfuré et l'on constate alors que la solution [108] contient des oses, de l'inositol, pas de glycérol et seulement des traces de phosphore.

Le précipité de sulfate de baryum a donc adsorbé la totalité des acides organophosphoriques simples libérés par l'hydrolyse acide. En effet ce phénomène d'adsorption est intense en milieu alcalin pour les composés de ce type⁽⁸⁾. On élue les acides organophosphoriques en traitant deux fois le sulfate de baryum par de petites quantités d'acide sulfurique N/20 chaud. L'éluat sulfurique [106] est riche en phosphore et donne une réaction de Denigès intense (il ne contient d'ailleurs pas d'oses) : il contient de l'acide glycérophosphorique. Des dosages colorimétriques par la réaction de Denigès effectués sur l'éluat avant et après hydrolyse à 150° pendant 2 heures montrent que l'éluat [106] contient un mélange d'acides α glycérophosphorique (3 parties) et β glycérophosphorique (2 parties).

b) *Hydrolyse sulfurique de la fraction [109]*

On soumet la fraction [109] pauvre en phosphore et riche en glucides au même traitement que la fraction précédente [105]. On obtient les mêmes résultats qualitatifs. On observe en outre

(8) Posternak (149) a même utilisé cette adsorption par le sulfate de baryum en présence d'un excès de baryte, comme méthode de purification des esters phosphoriques contenus dans les amidons.

l'adsorption d'une petite quantité d'oses par le sulfate de baryum en même temps que les acides organophosphoriques. Mais ces oses ne sont pas liés à l'acide phosphorique car après neutralisation de l'éluat par de la baryte, l'acétate neutre de plomb précipite l'acide glycérophosphorique [111] tandis que les oses restent dans la solution mère [112] du précipité. Ici l'acide *glycérophosphorique* n'existe que sous la forme α .

CONCLUSIONS

Dans les fractions les plus actives, une très petite quantité de l'acide phosphorique paraît liée directement à de l'inositol sous la forme d'acide inositolphosphorique.

L'acide phosphorique est presque entièrement sous la forme d'acide glycérophosphorique. Après l'hydrolyse barytique une partie de l'acide glycérophosphorique est à l'état d'acide simple, banal, donnant un sel de plomb insoluble dans l'eau ; l'autre partie de l'acide glycérophosphorique est sous la forme d'un ou plusieurs esters phosphoriques plus complexes dont l'ensemble possède seulement trois fonctions acides libres pour deux atomes de phosphore et dont les sels de plomb sont solubles dans l'eau.

II. — Hydrolyse barytique de la fraction inactive la plus soluble [Ip]

On hydrolyse 1 g. de la fraction [Ip], puis on fractionne l'hydrolysât en employant une technique identique à celle utilisée pour la fraction [A]. Les résultats sont donnés par le tableau XI (page 184).

1° Acides organophosphoriques précipités par l'acétate neutre de plomb

Lorsque l'on fractionne par l'alcool les acides organophosphoriques (libérés de leurs sels de plomb par de l'hydrogène sulfuré), on constate que la presque totalité de la fraction est soluble dans l'alcool : fraction [119] : 128 mg. Le résidu insoluble dans l'alcool [118] ne pèse que 20 mg.

L'importante fraction [119] soluble dans l'alcool est constituée par un mélange en égales parties environ d'acides α et β glycérophosphoriques.

La fraction [118] étant insoluble dans l'alcool, elle serait donc constituée par un ester phosphorique autre que l'acide glycérophosphorique. Afin d'étudier la nature de l'alcool qui estérifie l'acide phosphorique dans cette fraction, on soumet les 20 mg. de [118] à une autohydrolyse à 150° pendant 2 heures. On précipite l'acide phosphorique minéral libéré, par addition de sous-acétate de plomb à l'hydrolysât (la solution mère du précipité reste cependant acide). La solution mère doit contenir l'alcool qui était lié à l'acide phosphorique. Après avoir éliminé l'excès de plomb par l'hydrogène sulfuré, on évapore la solution à sec. Il reste un résidu [120] que l'on extrait par de l'alcool-éther. La solution alcoolo-éthérée [122] contient 8 mg. d'une substance qui n'est autre que du glycérol. Le résidu insoluble dans l'alcool éther [121] ne pèse que 5 mg.; c'est un verre dur, amorphe, très hygroscopique qui ne renferme pas trace d'inositol, ni d'ose, ni d'azote, mais qui contient par contre du phosphore et du glycérol. Cette fraction [121] soluble dans l'eau, mais insoluble dans l'alcool est donc très vraisemblablement constituée par du *glycérophosphate acide de plomb*.

C'est par une hypothèse semblable que l'on peut également expliquer l'existence de la fraction [118] insoluble dans l'alcool, mais soluble dans l'eau, puisqu'elle libère du glycérol par autohydrolyse à 150°. Ayant soumis à l'autohydrolyse un sel acide et non l'acide libre, la décomposition n'a pas été complète ; la petite fraction [121] insoluble dans l'alcool éther représente la partie de l'acide qui n'a pas été décomposée et qui n'a pas précipité par le sous-acétate de plomb grâce à la réaction acide du milieu. C'est probablement aussi à cause d'une trop forte acidité que la faible quantité de plomb contenue dans ces sels acides n'aurait pas été déplacée par l'hydrogène sulfuré.

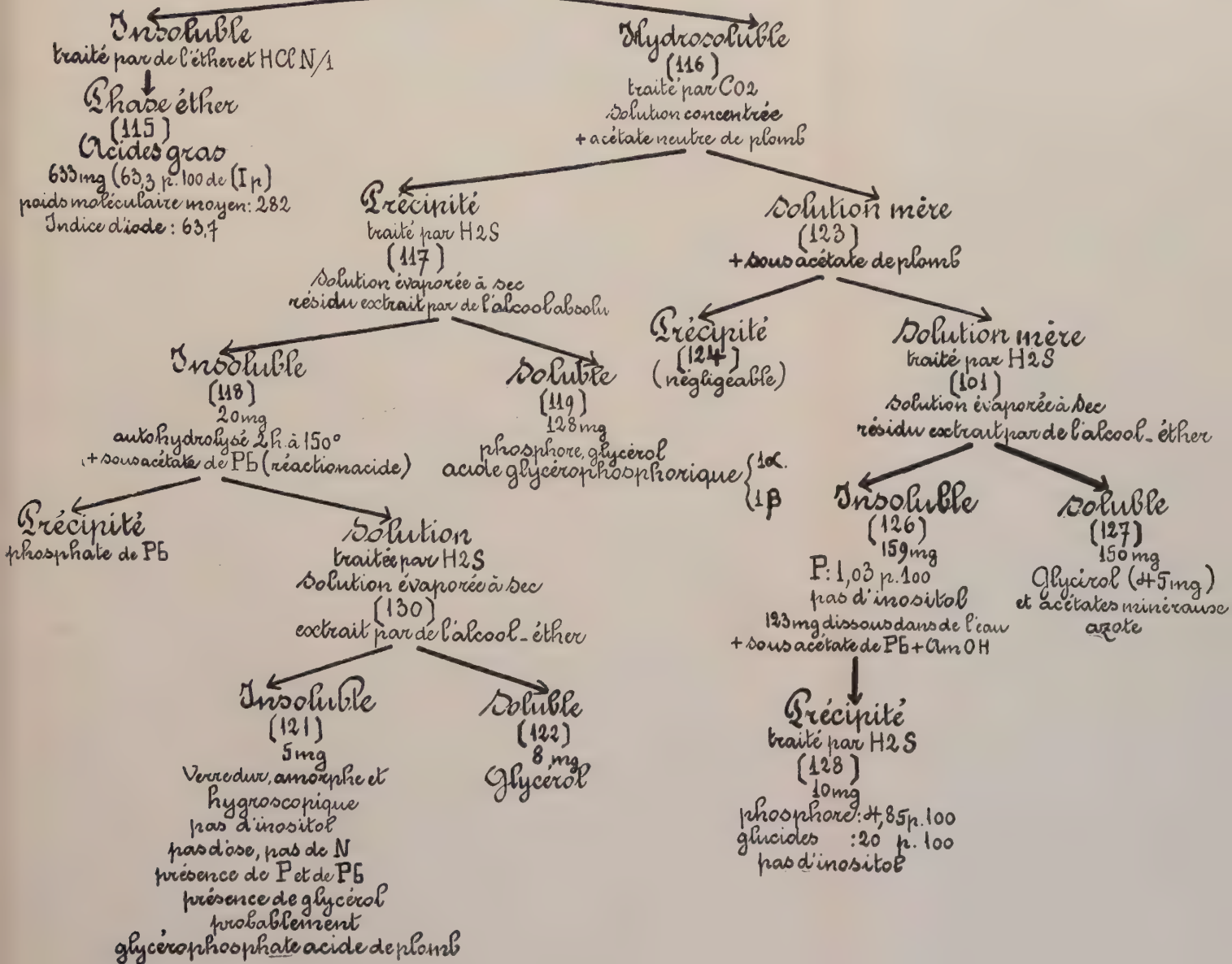
Donc, la totalité de l'acide organophosphorique précipitable par l'acétate neutre de plomb est de l'acide glycérophosphorique.

Lorsque l'on rapproche ces résultats de ceux obtenus avec les fractions analogues séparées de l'hydrolysât de la fraction la plus active [A], la substance amorphe et hygroscopique contenue dans la fraction [97] (tableau X, page 170), à côté des cristaux d'inositol, apparaît comme un sel acide de baryum d'un acide inositolphosphorique ou glycérophosphorique. On peut également expliquer la présence de glycérol dans l'autohydrolysât de l'acide organophosphorique insoluble dans l'alcool [93] par la

Tableau XI

Hydrolyse barytique de la fraction inactive la plus soluble (I_p)

1g de (I_p) + 100 cm³ de baryte N/10, bain-Marie bouillant 1 heure
insoluble + 10 cm³ de baryte N/10, bain-Marie bouillant 1 heure



présence dans cette fraction de glycérophosphate acide de plomb ou de baryum ⁽⁹⁾.

2° Glycérol libre

Après avoir éliminé l'excès de plomb contenu dans la solution mère du précipité par le sous-acétate de plomb, on extrait la fraction [125] avec de l'alcool éther. La solution alcoolo-éthérée [127] contient une quantité importante de glycérol : 45 mg. (cette fraction renferme également un peu d'azote).

3° Précipitation par le sous-acétate de plomb et l'ammoniaque

Le résidu insoluble dans l'alcool-éther est important : 195 mg., mais il est principalement constitué par de l'acétate de baryum (tout le baryum neutralisant l'acide glycérophosphorique dans l'hydrolysate barytique a été transformé en acétate par addition de l'acétate de plomb). Il renferme également une petite quantité de phosphore.

On précipite le composé phosphoré par addition de sous-acétate de plomb et d'ammoniaque. Après décomposition du précipité plombique par de l'hydrogène sulfuré, il reste une fraction [128] peu importante, mais riche en phosphore (4,85 p. 100). La petite quantité de glucides contenue dans la fraction [Ip] s'est concentrée dans cette fraction [128] qui en renferme 20 p. 100. (Ces glucides ne sont pas accompagnés d'inositol). Il est difficile de mettre en évidence la présence de glycérol même après hydrolyse acide à 150° ; la teinte verte de la réaction de Denigès est rapidement masquée par la teinte violet mauve donnée par les oses.

Nous disposons d'une trop petite quantité de substances pour pouvoir entreprendre une hydrolyse sulfurique à 120° et une séparation de l'acide glycérophosphorique très vraisemblablement présent. Il est cependant intéressant de remarquer, d'une part, que les oses ne sont pas accompagnés par de l'inositol, d'autre part, qu'ils coexistent, ici aussi, avec du phosphore non précipitable par les acétates neutre et basique de plomb. La non-précipitabilité du phosphore par l'acétate de plomb ne peut être

(9) Le glycérophosphate de baryum est soluble dans l'eau et insoluble dans l'alcool (27).

expliquée ici que par la présence des osides qui seraient donc liés à l'acide glycérophosphorique (à moins qu'il existe également dans cette fraction une substance autre que l'acide glycérophosphorique et les oses).

CONCLUSIONS

Dans l'hydrolysate barytique de la fraction inactive la plus soluble [Ip], il n'existe qu'une toute petite quantité de composé phosphoré non précipitable par les acétates neutre et basique de plomb ; ce composé phosphoré est accompagné par la très petite quantité de glucides présents dans la fraction [Ip], mais elle ne renferme pas d'inositol.

La fraction hydrosoluble de l'hydrolysate barytique est pratiquement constitué entièrement par de l'acide glycérophosphorique et du glycérol.

II. — Hydrolyse barytique de la fraction inactive la moins soluble [Im]

On soumet 1 g. de la fraction inactive la moins soluble [Im] au même traitement que les fractions [A] et [Ip]. Les résultats indiqués dans le tableau XII (page 188) sont qualitativement les mêmes que ceux donnés par la fraction la plus active [A] ; les différences sont seulement d'ordre quantitatif.

1° Acides organophosphoriques précipités par l'acétate neutre de plomb

L'hydrolyse barytique ne libère qu'une très petite quantité (23 mg.) d'acides organophosphoriques directement précipitables par l'acétate neutre de plomb [135] ; ils sont uniquement constitués par un mélange en égales parties des isomères α et β de l'acide glycérophosphorique.

La fraction phosphorée non précipitable par l'acétate basique de plomb est au contraire très importante [135].

2° Glycérol libre

Afin de séparer la petite quantité de glycérol que peut contenir cette fraction, au lieu d'extraire la fraction sèche par de

Tableau XII

Hydrolyse barytique de la fraction inactive la moins soluble (Im)

1 g. de (Im) + 100 cm³ de baryte N/10, bain-marie bouillant 1 heure
insoluble + 10 cm³ de baryte N/10, bain-marie bouillant 1 heure



l'alcool-éther, on la précipite de sa solution aqueuse par cinq volumes d'alcool-éther ; c'est ce qui explique la présence dans la solution éthéro-alcoolique [137] de 22 p. 100 de glucides qui masquent rapidement la coloration verte du glycérol dans la réaction de Denigès. (Notons également que dans cette fraction les oses ne sont pas accompagnés d'inositol).

3° Fraction précipitée par le sous-acétate de plomb et l'ammoniaque

La fraction précipitée par le sous-acétate de plomb et l'ammoniaque [138] est très riche en glucides (40 p. 100). Ces glucides donnent des réactions colorées (Bertrand et Sélivanoff) dont les teintes sont *identiques* à celles fournies par la fraction correspondante [104] (Tableau X, page 170) provenant de la fraction la plus active [A]. Il ne paraît donc pas y avoir de différences essentielles entre les oses contenus dans la fraction active [A] où ils sont peu abondants et dans la fraction inactive [Im] où ils sont beaucoup plus abondants.

Cette fraction phosphorée [138], non précipitable par l'acétate de plomb, possède également trois fonctions acides libres pour deux atomes de phosphore. Un fractionnement par précipitation de sa solution aqueuse par de l'alcool permet de séparer, d'une part, un précipité [139] contenant 3,3 p. 100 de phosphore et une grande quantité d'inositol et, d'autre part, une solution mère [144] qui renferme seulement 1,5 p. 100 de phosphore et de l'inositol en proportion bien moindre que le précipité. (Tandis que la réaction de Scherer donne un précipité rouge de rhodizionate de baryum lorsqu'on l'effectue avec 1,2 mg. du précipité [139], on ne voit même pas apparaître de coloration lorsqu'on effectue la réaction avec 1 mg. de la solution mère [144]). Cependant ces deux fractions contiennent sensiblement la même quantité de glucides (38 et 42 p. 100). Nous discuterons plus loin (page 195) les conclusions que l'on peut tirer de ces constatations.

Hydrolyse sulfurique des fractions précipitées par le sous-acétate de plomb et l'ammoniaque [139] et [144]

Par des hydrolyses sulfuriques à 120°, on démontre également ici que le phosphore non précipitable par l'acétate de plomb

contenu dans les deux fractions [139] et [144] est directement lié à du glycérol sous la forme d'acide glycérophosphorique. Cependant cet acide glycérophosphorique, quand il est libre, précipite par l'acétate de plomb, il faut donc admettre que, avant l'hydrolyse sulfurique, il était lui-même lié à un autre constituant pour former une molécule plus complexe.

Dans le cas de l'hydrolysats du précipité [139], l'adsorption par le sulfate de baryum de l'acide glycérophosphorique n'a pas été totale : l'addition d'acétate de plomb à la solution neutre [41] donne un précipité où l'on caractérise des traces d'inositol à côté du glycérol. Nous avons mis plus clairement en évidence la présence d'inositol dans une fraction analogue provenant de l'hydrolysats barytique d'une autre fraction inactive très peu soluble dans l'alcool méthylique.

Hydrolyse barytique d'une autre fraction inactive très peu soluble dans l'alcool méthylique

Cette fraction inactive très peu soluble dans l'alcool méthylique a été isolée au cours du même fractionnement que celui qui a donné la fraction [Im] ; c'est une fraction très voisine de [Im]. Cette fraction possède une activité hapténique $H = 1/200$ et elle présente la composition suivante : Phosphore : 1,84 p. 100, glucides : 11 p. 100. Elle est donc comparable à [Im]. L'hydrolysats barytique de 0,9 g. de cette fraction contient également une fraction phosphorée qui ne précipite ni par l'acétate neutre de plomb, ni par l'acétate basique : fraction phosphorée [151] (voir tableau XIII, page 191). Nous avons étudié cette fraction phosphorée [151] après l'avoir hydrolysée par de l'acide sulfurique à 120°, mais dans ce cas, pour éviter autant que possible l'adsorption des acides organophosphoriques par le sulfate de baryum, on précipite la totalité de l'acide sulfurique par de la baryte, sans neutraliser les acides organophosphoriques qui restent en grande partie en solution dans ce milieu acide où l'adsorption est bien moindre. On neutralise alors la solution [153] par de la baryte (qui ne provoque pas la formation de précipité), puis on élimine une fraction soluble dans l'alcool-éther [154]. On précipite les acides organophosphoriques par de l'acétate neutre de plomb, puis après les avoir libérés de leurs sels de plomb par de l'hydrogène sulfuré, on les extrait par de l'alcool absolu. On obtient deux fractions :

une fraction [158] soluble dans l'alcool	22 mg.
une fraction [157] insoluble dans l'alcool ..	4,1 mg.

Tableau XIII

Hydrolyse barytique d'une fraction inactive très peu soluble

Fraction (151) précipitée par le sous-acétate de plomb et l'ammoniaque

238mg { phosphore : 2,67 p. 100
glucides : 30 p. 100
inositol : présence

Hydrolysés 1h à 120° par $\text{DO} + \text{H}_2$ à 5 p. 100
 $\text{DO} + \text{H}_2$ précipité par la baryte (réaction acide)

Précipité ($\text{DO} + \text{Ba}$)
élution par HCl N/1

Éluat
(152)

P. minéral 0,12 mg
P. organique 1,5 mg
glycérol

Solution
(153)

neutralisée par $\text{Ba}(\text{OH})_2$ - concentrée
+ alcool - éther

Précipité
(155)

dissous dans de l'eau
+ acétate neutre de Pb

Solution
(154)

74 mg
glucides 25 p. 100
inositol : néant

Précipité
(156)

traité par H_2O
solution évaporée à sec
résidu extrait par de l'alcool absolu

Solution
(161)

+ sous-acétate de Pb + Am OH

Précipité
traité par H_2O

100 mg
P: 0,17 p. 100

Insoluble
(157)

4,1 mg
présence d'inositol

Soluble
(158)

21,8 mg
pas d'odeur
réaction de Denigès négative
reste 16 mg
autohydrolysés 2 h. à 150°
+ sous-acétate de Pb

Précipité
(159)

traité par H_2O
 $\text{PO} + \text{H}_3$

Solution
traitée par H_2O
(160)

8,7 mg
sirop de glycérol
et cristaux d'inositol

La fraction [157] insoluble dans l'alcool contient une quantité importante d'inositol.

La fraction [158] soluble dans l'alcool est principalement constituée par de l'acide β glycérophosphorique. Cependant elle contient également une petite quantité d'inositol, car après une autohydrolyse à 150°, on sépare du glycérol qui contient des cristaux d'inositol : fraction [160].

Il semble donc que les fractions inactives moins solubles contiennent également de l'acide glycérophosphorique et une très petite quantité d'acide inositolphosphorique. Mais ici cette petite quantité d'acide inositolphosphorique se trouverait, après l'hydrolyse barytique, à l'état d'une molécule plus complexe non précipitable par l'acétate de plomb.

CONCLUSIONS

L'hydrolyse barytique de la fraction inactive la moins soluble ne libère qu'une petite quantité d'acide organophosphorique directement précipitable par l'acétate de plomb qui est uniquement constituée par de l'acide glycérophosphorique.

La presque totalité du phosphore est sous la forme d'un composé plus complexe non précipitable par les acétates neutre et basique de plomb. Ce composé possède seulement trois fonctions acides libres pour deux atomes de phosphore. Il libère par hydrolyse sulfurique de l'acide phosphorique presque uniquement sous la forme d'acide glycérophosphorique ; cependant une très petite quantité de l'acide phosphorique serait sous la forme d'acide inositolphosphorique également inclus dans une molécule plus complexe avant l'hydrolyse sulfurique.

Comparaison des fractions hydrosolubles des hydrolysats barytiques des trois fractions [A], [Ip] et [Im]

Lorsque l'on compare les trois tableaux X, XI et XII, la fraction hydrosoluble de l'hydrolysat barytique de la fraction la plus active [A] apparaît clairement comme un mélange des fractions hydrosolubles des hydrolysats des deux fractions inactives [Ip] et [Im]. Malgré une étude détaillée de ces hydrolysats, nous ne sommes donc pas parvenue à découvrir de constituant particulier dans la fraction hydrosoluble de la fraction la plus

active [A]. Les hydrolysats des trois fractions contiennent tous de l'acide phosphorique et du glycérol et les hydrolysats de [A] et de [Im] renferment tous deux des glucides et de l'inositol.

Nous allons comparer successivement les différents types de fractions séparées des trois hydrolysats.

Acides organophosphoriques directement précipitables par l'acétate neutre de plomb

Ces acides organophosphoriques précipitables par l'acétate neutre de plomb sont à peu près uniquement constitués par de l'acide glycérophosphorique dans les hydrolysats des trois fractions.

Tandis que cet acide glycérophosphorique constitue la majeure partie (150 mg.) de la fraction hydrosoluble de l'hydrolysate de [Ip], il ne représente qu'une faible portion (23 mg.) de la fraction hydrosoluble de l'hydrolysate de [m], la majeure partie des acides organophosphoriques n'étant pas précipitable par l'acétate de plomb. Dans ces deux fractions inactives comme haptène, les acides organophosphoriques directement précipitables par l'acétate de plomb, sont uniquement constituées par des acides glycérophosphoriques α et β .

L'hydrolysate de la fraction active [A] contient également de l'acide glycérophosphorique simple (directement précipitable par l'acétate de plomb) ; il en contient une quantité intermédiaire entre celles des hydrolysats des fractions [Ip] et [Im]. Mais dans le cas présent, l'acide glycérophosphorique est accompagné par une petite quantité d'inositol qui paraît être à l'état d'acide inositolphosphorique. Ne disposant que d'une quantité minime de substances, il n'a pas été possible d'isoler à l'état pur le composé phosphoré contenant l'inositol (fraction [93], tableau X, page 170). Ce composé est accompagné de glycérophosphate acide, et nous ne savons pas si nous sommes en présence d'un mélange des acides glycérophosphorique et inositolphosphorique, ou si, au contraire, l'inositol est combiné à l'acide glycérophosphorique. La quantité d'inositol contenue dans cette fraction est si faible qu'il n'est pas possible d'affirmer avec certitude que l'ester phosphorique de l'inositol précipité par l'acécate neutre de plomb directement à partir de l'hydrolysate barytique de la fraction [A] représente un composé spécifique de cette fraction active. On peut se demander si la présence de cette petite quan-

tité d'inositol n'est pas due à l'entraînement par l'acide glycérophosphorique d'une petite quantité de la fraction qui précipite par le sous-acétate de plomb et l'ammoniaque, car cette fraction contient du phosphore et une quantité importante d'inositol (mais aussi des glucides). Il est cependant intéressant de noter que seul l'inositol (et non les glucides) aurait été entraîné par l'acide glycérophosphorique.

Quoiqu'il en soit, cet ester phosphorique de l'inositol ne paraît pas spécifique de la fraction [A]. En effet nous avons trouvé un composé semblable (fraction [157] tableau XIII, page 191) dans l'hydrolysât d'une fraction inactive peu soluble ; il faut cependant noter que dans cet hydrolysât barytique, ce composé phosphoré contenant de l'inositol existe sous la forme d'un ester plus complexe et qu'il n'est précipité par l'acétate de plomb qu'après une hydrolyse sulfurique à 120°.

Nous essayerons d'interpréter ces faits plus loin (page 209).

Fractions phosphorées, précipitées par le sous-acétate de plomb et l'ammoniaque

(mais qui n'avaient pas précipité par le sous-acétate de plomb).

La fraction [104] provenant de l'hydrolysât de [A] et la fraction [138] provenant de l'hydrolysât de [Im] ont une constitution analogue. Elles contiennent l'une et l'autre du phosphore, des oses et de l'inositol. Dans [Ip] cette fraction est négligeable.

Le phosphore. — Dans ces deux fractions le phosphore est à l'état d'esters phosphoriques complexes non précipitables par l'acétate de plomb et qui possèdent trois fonctions acides libres pour deux atomes de phosphore. Dans les deux cas l'hydrolyse sulfurique à 120° décompose les esters complexes et libère l'acide phosphorique sous la forme d'acide glycérophosphorique simple précipitable par l'acétate neutre de plomb.

Les oses. — L'étude des oses contenus dans ces deux fractions ne nous a pas révélé de différence essentielle : dans les deux cas, les glucides sont uniquement constitués par des aldohexoses. Il n'est naturellement pas suffisant de se baser sur des réactions colorées générales des oses pour affirmer l'identité des oses contenus dans les fractions [A] et [Im] ; mais, n'ayant pas caractérisé d'acide uronique, ni de cétose, ni de pentose, nous

n'avons pas entrepris la séparation de molécules aussi voisines que le sont des aldohexoses sur des quantités de substances aussi petites que celles qui restaient après toutes ces recherches.

L'inositol. — Quoique nous n'ayons pas effectué le dosage d'inositol (des dosages sont pratiquement impossibles avec des quantités de substances aussi petites et des mélanges aussi complexes), l'intensité de la réaction de Scherer permet cependant d'affirmer que la fraction [104] qui provient de [A] est plus riche que la fraction correspondante [138] qui provient de [Im], mais cette différence quantitative des teneurs en inositol ne paraît nullement en rapport avec les activités hapténiques des deux fractions [A] et [Im].

On voit donc que tous les constituants, et même les complexes formés par les constituants que nous avons isolés de la fraction hydrosoluble de l'hydrolysât barytique de la fraction active [A] sont également présents dans les hydrolysats des fractions inactives [Ip] et [Im]. Nous ne sommes donc pas parvenue jusqu'à présent à découvrir dans cette fraction hydrosoluble de l'hydrolysât barytique de [A] une substance particulière à laquelle on puisse attribuer l'activité et la spécificité sérologique de la fraction si active [A].

Rapport entre l'inositol et les oses

Nous avons vu dans la partie historique de ce travail (page 62) qu'Anderson prétend que les oses et l'inositol contenus dans « le phosphatide purifié »⁽¹⁰⁾ du Bacille tuberculeux sont liés pour former une molécule osidique de « dimanninositose ». Nous avons déjà alors critiqué cette affirmation plausible, mais insuffisamment démontrée. Notre travail en a démontré l'inexactitude.

En effet lorsque l'on compare les diverses fractions précipitées par le sous-acétate de plomb et l'ammoniaque à partir des hydrolysats barytiques, les teneurs en glucides et l'intensité de la réaction de Scherer permettent de conclure qu'il *n'y a aucune relation quantitative entre les oses et l'inositol.*

(10) Notre travail montre clairement que la fraction phosphatique des Bacilles tuberculeux est constituée par un mélange complexe de lipides phosphorés et non par *un* unique phosphatide comme Anderson paraît le croire.

	[A] (tableau X)		[Im] (tableau XII)		Inactif peu soluble (tableau XIII) [151]	[Ip] (tableau XI) [128]
	[105]	[109]	[139]	[144]		
Poids du prélèvement ..	1,2 mg	1 mg.	1,2 mg	1 mg.	1 mg.	2 mg.
Ino- sitol } Importance du { précipité rouge { de rhodizonate { de Ba	Préci- pité	Trace de précipité	Petit précipité	Pas de colo- ration	Petit précipité	Néant
Glucide p. 100	16	32	38	42	30,6	20
Phosphore p. 100	5,6	1,9	3,3	1,5	2,67	4,85

De plus l'existence dans ces mêmes hydrolysats barytiques, de fractions qui, sans avoir été soumises à une hydrolyse acide renferment soit des osides en l'absence d'inositol: fractions [128] (tableau XI) et [137] (tableau XII), soit de l'inositol en l'absence d'osides: fraction [93] (tableau X) et même de l'inositol libre puisqu'il est cristallisé: fraction [75] (tableau VIII) et [88] (tableau IX) permet d'affirmer que la *totalité des oses et de l'inositol n'est pas uni par une liaison osidique pour former une seule espèce de molécule.*

La composition des fractions inscrites dans le tableau précédent laisse prévoir également que l'acide glycérophosphorique, les oses et l'inositol ne sont pas leurs seuls constituants. Dans la fraction [144], par exemple, si l'on calcule la quantité d'acide glycérophosphorique (d'après la teneur en phosphore et en supposant que cet acide est à l'état de sel neutre de baryum) soit 15 p. 100, puis si l'on ajoute ces 15 p. 100 aux 42 p. 100 de glucides, il reste $100 - (15 + 42) = 43$ p. 100 de substance qui, si elle était uniquement constituée par de l'inositol, donnerait une réaction de Scherer intense même avec 1 mg. de la fraction [144], ce qui n'est pas le cas. Nous ne connaissons rien de la nature de ce constituant supplémentaire. Nous savons seulement qu'il ne possède pas de fonction acide, car, après hydrolyse sulfurique à 120°, des fractions [109] et [144] et séparation de l'acide glycérophosphorique, les fractions [149] et [114] ne renferment que des traces d'acidités et des traces de baryum. Ce constituant ne contient pas non plus de phénol (réaction de Millon négative et pas de coloration avec Fe^{+++}) ; c'est vraisemblablement un polyol.

ETUDE DES ACIDES GRAS DES TROIS FRACTIONS [A], [Ip] et [Im]

N'étant pas parvenue à découvrir dans la partie hydrosoluble de l'hydrolysât barytique de [A] une substance particulière à laquelle on puisse attribuer l'activité hapténique de la fraction si active [A], nous avons alors entrepris l'étude comparative des parties insolubles des hydrolysats barytiques (savons de baryum) des trois fractions [A], [Ip] et [Im].

Nous avons vu (page 172) comment en traitant la fraction insoluble dans l'eau de l'hydrolysât barytique de [A] par de l'acide chlorhydrique dilué et de l'éther, on obtient une solution éthérée limpide qui, par évaporation, laisse déposer des acides gras solides blancs et bien cristallisés représentant 55 p. 100 de la fraction [A].

Lorsque l'on soumet la fraction insoluble dans l'eau de l'hydrolysât de [Ip] au même traitement, on obtient également une solution éthérée parfaitement limpide, mais colorée ; les acides gras qu'elle contient forment une masse molle, jaune brun, partiellement cristallisée représentant 63 p. 100 de la fraction inactive la plus soluble [Ip].

La fraction insoluble de l'hydrolysât de [Im], au contraire, ne donne pas une solution éthérée limpide après l'action de l'acide chlorhydrique dilué ; entre les phases aqueuse et éthérée, il reste une importante fraction insoluble que l'acide chlorhydrique ne décompose pas. On rassemble la solution éthérée trouble et la fraction insoluble dans l'eau et dans l'éther ; après les avoir bien lavées, on évapore le tout à sec, puis on dissout le résidu d'évaporation dans du chloroforme. Par évaporation, la solution chloroformique laisse une masse blanche opaque qui représente 57 p. 100 de la fraction [Im]. On sépare alors à partir de ce mélange soluble dans le chloroforme d'une part, la fraction soluble dans l'éther et d'autre part, la fraction insoluble dans l'éther.

La fraction soluble dans l'éther est également soluble dans l'acétone ; elle contient les acides gras qui représentent seulement 44 p. 100 de la fraction [Im].

La fraction insoluble dans l'éther (13 p. 100 de [Im]) forme une masse blanche soluble dans le chloroforme, mais insoluble dans l'acétone et l'alcool bouillants. Elle ne contient pas trace de phosphore et ne possède pas de fonction acide. Son insolubi-

lité dans l'éther permet de supposer qu'elle était liée à des acides gras dans la fraction [Im] qui est parfaitement soluble dans l'éther. Elle constitue vraisemblablement un « insaponifiable » qui, dans la fraction [Im], était estérifiée par des acides gras pour former une « cire », type de substances très abondantes dans le Bacille tuberculeux. Nous n'avons pas pu éliminer cette « cire » des phosphatides à cause de son insolubilité dans l'acétone bouillante, et, grâce à sa très faible solubilité dans l'alcool, elle s'est concentrée dans la fraction la moins soluble [Im]. Nous supposons que c'est la présence de cette « cire », certainement insoluble dans l'eau, qui donne à l'émulsion aqueuse de [Im] son aspect trouble. Nous n'avons pas poursuivi l'étude de cet « insaponifiable », car il ne représente pour nous qu'une impureté et la fraction active [A] n'en renferme pas trace.

Nous avons déterminé les poids moléculaires moyens des acides gras séparés à partir des trois fractions, par un titrage direct de l'acidité par de la potasse alcoolique en présence de phtaléine. Afin d'éviter la formation d'ester éthylique, on dissout 20 à 30 mg. de l'acide gras dans de l'alcool à 90°, on porte la solution à l'ébullition, puis on neutralise la solution bouillante par de la potasse N/5 environ (dissoute également dans de l'alcool à 90°) jusqu'à virage de la phtaléine. On détermine le titre exact de la potasse alcoolique par des titrages d'acide palmitique et d'acide stéarique purs dans des conditions expérimentales identiques.

Les indices d'iode des acides gras des trois fractions ont été déterminés par la microméthode de Chargaff (28).

Afin de déterminer avec plus de précision les teneurs en acides gras des trois fractions, nous avons hydrolysé de petites quantités de ces fractions par de l'acide sulfurique à 5 p. 100 à 120°. On sépare alors les fractions insolubles dans l'eau, puis on les pèse directement après lavage. On obtient avec les fractions [A] et [Ip] des teneurs en acides gras (respectivement 56 p. 100 et 66 p. 100) légèrement supérieures à celles données par l'hydrolyse barytique où les multiples manipulations ont entraîné une légère perte de substance. Avec la fraction [Im] on obtient un taux de substances insolubles dans l'eau (acides gras et « insaponifiable » réunis) identique à celui donné par l'hydrolyse barytique, soit 57 p. 100.

Les résultats de ces déterminations sont rassemblés dans le tableau suivant :

Fractions	« Insaponifiable » insoluble dans l'éther p. 100	Acides gras		
		Poids p. 100	Poids molé- culaire moyens	Indice d'iode
Inactive la plus soluble [Ip].	0	66	282	63,7
La plus active [A]	0	56	278	5,2
Inactive la moins soluble [Im]	13	44	279	2,7

Si, d'une part, on observe que les teneurs en acides gras sont nettement différentes dans les trois fractions, d'autre part on constate qu'ils possèdent le même poids moléculaire moyen ; mais les acides gras de la fraction la plus soluble [Ip] se différencient nettement par leur indice d'iode relativement élevé des acides gras pratiquement saturés des deux autres fractions.

Conclusion. — On ne peut pas attribuer aux acides gras de la fraction [A] qui paraissent identiques à ceux de la fraction [Im] la spécificité et l'activité hapténique de la fraction si active [A].

CONCLUSIONS DE L'ETUDE COMPARATIVE DE LA CONSTITUTION CHIMIQUE DES TROIS FRACTIONS [A], [Ip] et [Im]

Conclusions d'ordre chimique

Fraction inactive la plus soluble [Ip]. — Cette fraction possède une constitution relativement simple et se différencie nettement des deux autres. Elle est pratiquement constituée par des sels de sodium, de calcium et de magnésium d'acides glycérophosphatidiques contenant des acides gras non saturés ⁽¹¹⁾.

(11) Cette fraction correspond vraisemblablement aux acides phosphatidiques décrits par Bloch dans les bacilles tuberculeux humains ; mais on voit qu'ils sont très loin de constituer la totalité des phosphatides de ces bacilles.

Fraction la plus active [A]. — Elle paraît constituée par des sels de sodium, de calcium et de magnésium d'un mélange de deux types d'acides phosphatidiques qui ne contiennent que des acides gras saturés.

1° Des acides glycérophosphatidiques simples analogues à ceux qui constituent la fraction [Ip] (mais ne contenant que des acides gras saturés) et peut-être aussi une très petite quantité d'acide inositophosphatidique.

2° Des acides glycérophosphatiques plus complexes dans lesquels l'acide glycérophosphorique est sûrement lié à autre chose, très vraisemblablement à des oses et à de l'inositol.

Fraction inactive la moins soluble [Im]. — Elle possède une constitution analogue à celle de la fraction [A] ; mais elle paraît renfermer une quantité moindre d'acide glycérophosphatidique simple et au contraire une plus forte proportion d'acides glycérophosphatidiques complexes. Elle contiendrait peut-être aussi une petite quantité d'acide inositophosphatidique complexe. Les acides gras sont également tous saturés. La fraction [Im] contient également une petite quantité de « cire » qui par hydrolyse libère un « insaponifiable » insoluble dans l'éther.

Il n'est pas impossible, en outre, qu'une partie de l'inositol, mais surtout des glucides contenus dans la fraction [A] et surtout dans la fraction [Im] (pauvre en phosphore) entrent dans la constitution de lipides non phosphorés.

Conclusions d'ordre immunologique

L'étude des cations, des acides gras, des esters phosphoriques et des alcools (glycérol, oses, inositol) contenus dans la fraction la plus active [A] ne nous a pas permis, jusqu'à présent, de découvrir une substance à laquelle on puisse attribuer son activité hapténique.

Cependant, cette fraction qui est peu différente du point de vue chimique d'autres fractions inactives, possède une activité sérologique considérable (on peut la mettre en évidence à la dose de 0,06 γ).

Pour expliquer ces faits, deux hypothèses sont possibles :

— ou bien l'haptène ne représente encore qu'une infime partie de cette préparation. Sa molécule peut alors posséder une constitution très différente de celle des lipides qui l'accompagnent ;

mais elle serait douée d'une activité sérologique beaucoup plus grande encore que celle de la préparation **[A]** ;

— ou bien l'haptène constitue une partie relativement importante de cette fraction **[A]**. Sa molécule serait alors constituée par un acide phosphatidique peu différent des acides phosphatidiques contenus dans les fractions inactives, mais portant le groupement responsable de l'activité et de la spécificité sérologique de l'haptène.

On peut cependant affirmer que la totalité des acides phosphatidiques contenus dans les bacilles tuberculeux ne sont pas actifs : en particulier les glycérophosphatidates simples et ba-
naux de sodium, de calcium et de magnésium contenant des acides gras non saturés ne sont pas hapténiques.

HYDROLYSE SULFURIQUE A FROID D'UNE FRACTION TRES ACTIVE

Lorsque nous avons traité des fractions très actives par des acides minéraux dilués à froid, nous avons chaque fois remarqué d'une part que l'activité hapténique disparaissait partiellement, d'autre part qu'une partie importante des acides gras était libérée. Nous avons alors cherché à utiliser ce pouvoir hydrolysant à froid des acides minéraux dilués pour libérer les acides gras d'une fraction très active, pensant que cette méthode permettrait de réaliser une décomposition des lipides moins brutales que l'hydrolyse barytique à 100°. En effet, l'hydrolyse acide nous a permis d'obtenir quelques nouveaux résultats intéressants.

Nous avons utilisé pour cette étude, la fraction très active [40] dont nous avons déjà décrit l'hydrolyse barytique (page 160).

Technique de l'hydrolyse sulfurique à froid

On dissout 500 mg. de la fraction [40] dans 30 cm³ d'eau, puis on ajoute goutte à goutte 10 cm³ d'acide sulfurique 4 N de façon à obtenir une solution sulfurique N/1. La substance forme un précipité floconneux qui se rassemble rapidement au fond du récipient. Afin de favoriser le contact entre la substance et l'acide sulfurique, on soumet l'ensemble à une agitation mécanique vigoureuse. Après trois jours de contact, on extrait par de l'éther les acides gras libérés et la substance qui n'aurait pas été décomposée.

La phase aqueuse contient les esters phosphoriques et les divers alcools qui étaient estérifiés par des acides gras dans la préparation initiale. On précipite l'acide sulfurique par de la baryte en léger excès. Cet excès est éliminé à son tour par du gaz carbonique. La solution contient 195 mg. de substances.

Afin de décomposer les lipides qui n'auraient pas été hydrolysés après trois jours de contact avec de l'acide sulfurique N/1, on agite la phase éthérée précédente avec 10 cm³ d'acide sulfurique N/1 pendant quatre jours. On sépare les phases aqueuse et éthérée.

Après élimination de l'acide sulfurique, la phase aqueuse contient seulement 18 mg. de substances. Donc après trois jours de contact avec l'acide sulfurique N/1 froid, la décomposition des lipides était déjà presque totale.

Cette deuxième phase éthérée contient les acides gras ; après évaporation de l'éther, ils forment une masse blanche bien cristallisée qui ne renferme que des traces négligeables de phosphore (0,1 p. 100). Ce fait montre que l'hydrolyse de la fraction [40] a bien été totale.

Lorsque l'on élimine l'acide sulfurique des phases aqueuses par un léger excès de baryte, le sulfate de baryum formé adsorbe une petite quantité d'esters phosphoriques. En effet, si l'on traite le sulfate de baryum avec de l'acide chlorhydrique N/1 chaud, on constate que l'éluat chlorhydrique renferme 1,5 mg. de phosphore qui se trouve entièrement à l'état de composés organiques.

Fraction hydrosoluble de l'hydrolysat sulfurique

On réunit les substances provenant des deux phases aqueuses. Elles contiennent la partie hydrosoluble de l'hydrolysat sulfurique : fraction [162].

Cette fraction contient 3,27 p. 100 de phosphore, de l'inositol et 21 p. 100 d'oses à l'état d'osides qui ne présentent pas le moindre pouvoir réducteur. L'hydrolyse sulfurique à froid a donc permis de libérer la totalité des acides gras sans rompre les liaisons osidiques. Cependant, après cette décomposition, la totalité du pouvoir hapténique de la préparation [40] a disparu ; on ne peut pas déceler la moindre trace d'haptène ni dans la fraction hydrosoluble de l'hydrolysat barytique, ni dans la fraction éthérosoluble (acides gras). *Si donc des osides entrent dans la constitution de l'haptène, ces osides seuls sont incapables de fixer l'alexine en présence de sérum antituberculeux.* L'activité hapténique appartenait à une substance qui a été détruite par cette hydrolyse acide très douce qui n'a pas hydrolysé du tout les osides.

Tentative de fractionnement de la fraction [162]

(hydrosoluble de l'hydrolysat sulfurique)

par l'acétate neutre et l'acétate basique de plomb

Nous avons alors tenté de fractionner la fraction hydrosoluble par une méthode analogue à celle utilisée pour les hydrolysats barytiques.

A notre grande surprise, l'addition d'acétate neutre de plomb à la solution aqueuse de la fraction [162], n'a fait apparaître aucun précipité et l'addition d'acétate basique n'a donné qu'un précipité infime [163] (pesant 5,8 mg. après élimination du plomb par de l'hydrogène sulfuré). Même si l'on admet que la

totalité des composés phosphorés adsorbés par le sulfate de baryum est constituée par des acides organophosphoriques simples précipitables par l'acétate neutre de plomb, cette quantité d'acides organophosphoriques simples contenus dans l'hydrolysât sulfurique est bien faible (elle correspond à 8,3 mg. d'acide glycérphosphorique). Dans l'hydrolysât sulfurique, la majeure partie du phosphore est donc à l'état l'acide organophosphorique complexe non précipitable par l'acétate neutre de plomb ou même par l'acétate basique.

Si l'on compare ces résultats à ceux fournis par l'hydrolysât barytique de la même préparation [40] (voir tableau IX, page 165), on constate que l'hydrolysât sulfurique renferme une quantité d'acides organophosphoriques complexes (non précipitables par l'acétate de plomb), beaucoup plus grande (7 mg. de phosphore) que l'hydrolysât barytique (2,3 mg. de phosphore). Inversement, la quantité d'acides organophosphoriques simples (précipitables par l'acétate neutre de plomb) contenue dans l'hydrolysât barytique est bien supérieure (6,2 mg. de phosphore), à celle que l'éluat chlorhydrique du sulfate de baryum de l'hydrolysât sulfurique peut au maximum contenir (1,5 mg. de phosphore). Il faut donc admettre que l'hydrolyse barytique avait décomposé une grande partie des acides organophosphoriques complexes, et que cette décomposition a libéré des acides organophosphoriques simples : de l'acide glycérphosphorique principalement. On peut donc conclure que, dans les esters organophosphoriques complexes qui ont été décomposés par une hydrolyse barytique, l'acide glycérphosphorique était lié à autre chose par une fonction ester. Nous avons vu précédemment que les fractions hydrosolubles des hydrolysats de nos fractions lipidiques ne renferment pas de fonction acide organique ; par conséquent il faut admettre que dans ces esters organophosphoriques complexes, une fonction acide de l'acide phosphorique est estérifiée par du glycérrol, et une deuxième fonction acide est estérifiée par un autre alcool (vraisemblablement des glucides ou de l'inositol).

Purification et étude des acides organophosphoriques complexes non précipitables par l'acétate basique de plomb

Afin d'étudier les acides organophosphoriques complexes contenus dans la solution mère de l'infime précipité obtenu par addition de sous-acétate de plomb, on élimine l'excès de plomb

par de l'hydrogène sulfuré, on obtient alors les acides organophosphoriques (172 mg.). Après avoir chassé toute trace d'acide acétique (dans un vide profond en présence de chaux), on neutralise les acides avec de la baryte. On purifie alors les sels de baryum obtenus par deux précipitations de leur solution aqueuse par trois volumes d'alcool : fraction [165].

La fraction [165] contient 3,4 p. 100 de phosphore et 10,3 p. 100 de baryum (soit deux atomes de baryum pour trois atomes de phosphore). Les esters organophosphoriques complexes contenus dans cette fraction possèdent donc seulement quatre fonctions acides libres pour trois atomes de phosphore.

Extraction de l'inositol libre (s'il y en a) par l'alcool à 80° bouillant

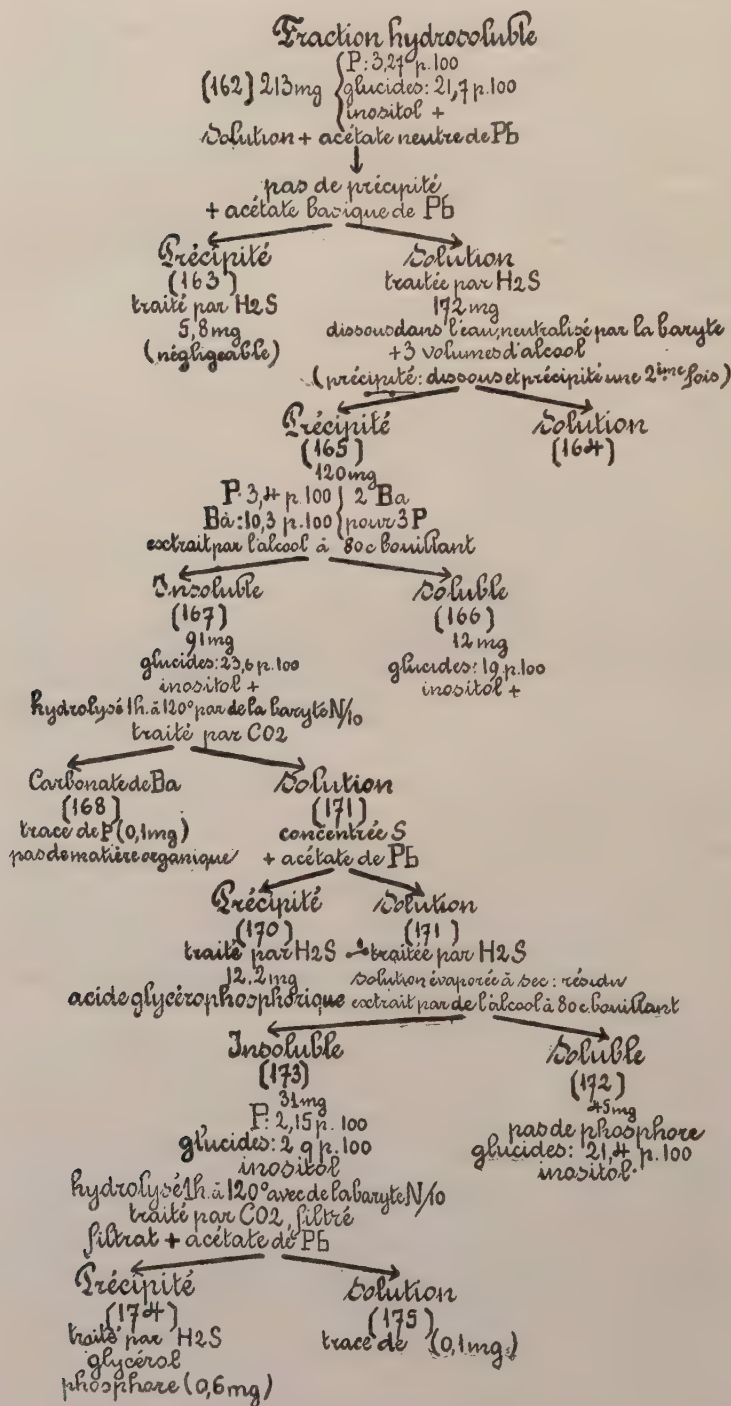
Afin de vérifier que l'inositol contenu dans cette fraction n'est pas libre, mais combiné, on extrait les 104 mg. qui restent de la fraction [165], cinq fois par de l'alcool à 80 c. bouillant. L'inositol libre est soluble dans l'alcool à 80° bouillant d'où il précipite par refroidissement (73). L'extract alcoolique [166] ne contient qu'une très petite quantité de substance (12 mg.) qui renferme des glucides (19 p. 100) et un peu d'inositol. La fraction [167] insoluble dans l'alcool à 80° bouillant est beaucoup plus abondante et pèse 91 mg. ; elle renferme de *l'inositol qui est donc certainement combiné puisqu'il ne s'est pas dissous dans l'alcool à 80° bouillant.*

La fraction [167] contient également 23 p. 100 de glucides. On peut déjà supposer que ces glucides, eux aussi, sont liés à autre chose, car ils ne se sont pas dissous dans l'alcool à 80° bouillant comme les glucides passés dans la fraction [166] (soluble dans l'alcool à 80°).

Nous avons alors cherché à savoir si la totalité de l'acide glycérphosphorique qui entre dans la constitution des esters organophosphoriques complexes contenus dans cette fraction est liée à d'autres alcools uniquement par des fonctions esters ; autrement dit, nous avons cherché si l'on peut libérer la totalité de cet acide glycérphosphorique par une hydrolyse alcaline qui doit rompre les liaisons esters sans toucher les liaisons éthers. Dans ce but nous avons soumis la fraction [167] à une hydrolyse barytique.

Tableau XIV

Hydrolyse sulfurique à froid de 500 mg d'une fraction très active (4)



Hydrolyse barytique de la fraction [167] (insoluble dans l'alcool à 80° bouillant)

On chauffe les 84 mg. qui restent (après analyse) de la fraction [167] dans 2 cm³ de baryte N/10 pendant une heure à 120°.

On précipite la baryte par du gaz carbonique. (Le précipité de carbonate de baryum n'entraîne qu'une trace infime de phosphore 0,1 mg. qui est à l'état d'acide phosphorique minéral). On concentre la solution [69], puis on ajoute de l'acétate neutre de plomb de façon à précipiter les acides organophosphoriques simples libérés par l'hydrolyse barytique.

Le précipité plombique [170] décomposé par de l'hydrogène sulfuré donne 12,2 mg. d'un acide organophosphorique sirupeux qui n'est autre que de l'acide glycérophosphorique (présence de phosphore, réaction de Denigès positive). Ce fait confirme directement les conclusions que nous avons tirées de la comparaison des hydrolysats barytique et sulfurique de la préparation [40] : de l'acide glycérophosphorique est lié à autre chose par une fonction ester pour former un acide glycérophosphorique complexe (non précipitable par l'acétate de plomb).

Dans la solution mère du précipité plombique [171], on doit donc trouver les alcools qui estérifiaient une fonction acide de l'acide glycérophosphorique libéré par l'hydrolyse barytique. Pour les étudier, on élimine par de l'hydrogène sulfuré l'excès de plomb contenu dans cette solution mère, puis on évapore la solution à sec. On extrait alors le résidu d'évaporation par de l'alcool à 80° bouillant. Une portion importante du résidu se dissout (fraction [172] soluble dans l'alcool à 80° bouillant) (45 mg.), mais il reste un résidu insoluble dans l'alcool à 80° (fraction [172] : 31 mg.).

La fraction [172] soluble dans l'alcool à 80° bouillant ne renferme que des traces infimes de phosphore ; par contre, elle contient des glucides (21 p. 100) et de l'inositol qui avant l'hydrolyse barytique n'étaient pas solubles dans l'alcool à 80°. On peut donc affirmer que ces glucides et cet inositol estérifiaient une fonction acide de l'acide glycérophosphorique pour former des esters glycérophosphoriques complexes.

La fraction [173] insoluble dans l'alcool à 80° bouillant après l'hydrolyse barytique renferme encore 2,15 p. 100 de phosphore ; elle contient également des glucides (29 p. 100) et de l'inositol (mais en proportion nettement moindre que la fraction [172])

soluble dans l'alcool à 80°). Cet ester phosphorique complexe non précipitable par l'acétate neutre de plomb représente-t-il un autre type d'ester complexe (formule I, page 177), d'où l'hydrolyse alcaline est incapable de libérer l'acide glycérophosphorique, ou bien est-ce seulement une portion non hydrolysée du même type d'ester que celui qui a été décomposé par l'hydrolyse barytique précédente ? Afin de donner une réponse à ces questions, nous avons soumis la fraction [173] à une nouvelle hydrolyse barytique.

Deuxième hydrolyse barytique de l'ester phosphorique complexe qui a résisté à la première hydrolyse barytique

On chauffe les 20 mg. qui restent de la fraction [173] dans 1 cm³ de baryte N/10 pendant une heure à 120°. Après avoir éliminé la baryte par du gaz carbonique, on ajoute de l'acétate neutre de plomb à la solution. Il se forme un précipité : il y a donc eu libération d'une nouvelle quantité d'acide organophosphorique simple. On sépare ce précipité plombique, puis, après avoir éliminé le plomb par de l'hydrogène sulfuré, on constate que l'acide organophosphorique n'est autre que de l'acide glycérophosphorique (réaction de Denigès positive, présence de phosphore : 0,6 mg.).

Afin de nous rendre compte si, après cette deuxième hydrolyse barytique, il ne restait plus d'acide organophosphorique complexe non précipitable par l'acétate neutre de plomb, nous avons dosé le phosphore contenu dans la solution mère [175] du précipité plombique. Nous avons constaté que cette solution mère contenait seulement une trace négligeable de phosphore (0,1 mg.).

On peut donc conclure que *la totalité de l'acide glycérophosphorique qui entre dans la constitution des esters organophosphoriques complexes est liée à d'autres alcools (glucides et inositol) par des fonctions esters phosphoriques.*

CONCLUSIONS

La majeure partie, et peut-être la totalité, du phosphore contenu dans la fraction très active [40] est sous la forme d'esters organophosphoriques complexes constitués par de l'acide glycérophosphorique simple estérifié par des glucides et de l'inositol pour former des acides glycérophosphoriques complexes.

Discussion et essais d'interprétation de certains résultats obtenus lors des hydrolyses barytiques des diverses fractions lipidiques et de l'hydrolyse sulfurique à froid.

Nous ne savons pas si les glucides et l'inositol libérés par l'hydrolyse barytique des esters complexes entrent dans la constitution de deux acides glycérophosphoriques complexes différents ; l'un glucido-glycérophosphorique, l'autre inosito-glycérophosphorique ou bien si les oses et l'inositol sont liés par une fonction osidique pour former un hétéroside. Dans ce cas, l'hétéroside estérifiant l'acide glycérophosphorique, nous serions en présence d'une seule molécule d'acide glucido-inosito-glycérophosphorique.

Cependant une partie au moins de l'inositol est uniquement liée par une fonction ester à de l'acide phosphorique puisque, à plusieurs reprises, nous avons trouvé dans des produits d'hydrolyse barytique, d'une part, des fractions phosphorées contenant de l'inositol en absence de glucides et d'autre part, des fractions contenant de l'inositol cristallisé, donc libre. *Une partie au moins de l'inositol contenu dans ces fractions lipidiques se trouve très vraisemblablement sous la forme d'un diester inosito-glycérophosphorique.* La liaison ester glycérophosphorique est probablement plus résistante à l'hydrolyse que la liaison ester inositophosphorique, puisque les hydrolyses barytique et sulfurique à 120° libèrent l'acide phosphorique presque uniquement sous la forme d'acide glycérophosphorique. Cependant une faible proportion de la liaison ester inositophosphorique peut être conservée tandis que la liaison ester glycérophosphorique est rompue dans la même molécule ; on obtient alors de l'acide inositophosphorique simple. Cette hypothèse permet d'expliquer la présence des petites quantités d'acides inositophosphoriques que nous avons trouvées à côté de l'acide glycérophosphorique dans les produits d'hydrolyse des diverses fractions lipidiques actives et inactives qui renferment de l'inositol. La présence de cet acide inositophosphorique à la fois dans la fraction directement précipitable par l'acétate neutre de plomb de l'hydrolysate barytique de la fraction très active [A] (tableau X, page 170) et dans les produits d'hydrolyse sulfurique à 120° des esters organophosphoriques complexes (non précipitables par l'acétate de plomb) de l'hydrolysate barytique de la fraction inactive [Im] (tableau XII, page 188) peut s'expliquer par

l'existence d'un même composé: le *diester inosito-glycéro-mono-phosphorique*, dans les deux fractions [A] et [Im] où il est estérifié par des acides gras.

Il est fort probable également qu'une partie au moins des glucides estérifie directement de l'acide glycérphosphorique simple pour former un diester glucido-glycérphosphorique, car nous avons également obtenu des fractions contenant des esters phosphoriques complexes non précipitables par l'acétate de plomb et renfermant des glucides en l'absence d'inositol. Mais nous n'avons jamais pu mettre en évidence d'esters glucidophosphoriques simples précipitables par l'acétate de plomb. Toutes les fractions précipitables par le plomb que nous avons séparées des divers hydrolysats ne contenaient que des traces négligeables de glucides ⁽¹²⁾.

RESUME ET CONCLUSIONS DU CHAPITRE III

Pour effectuer l'étude chimique comparative des trois types de fractions que nous avons décrites dans le chapitre précédent, nous avons utilisé trois fractions isolées à partir d'un même extrait alcoolique de bacilles. Nous désignons ces trois fractions par les abréviations suivantes ⁽¹³⁾ :

[A] : fraction la plus Active (fraction [36]).

[Ip] : fraction Inactive la Plus soluble (fraction [38]).

[Im] : fraction Inactive la Moins soluble (fraction [39]).

L'analyse minérale spectrographique des cendres de ces trois fractions montre que les acides phosphatidiques qu'elles contiennent sont neutralisés par les mêmes cations : sodium, calcium et magnésium qui sont présents en proportions sensiblement équivalentes.

Les trois fractions ont été décomposées par une hydrolyse barytique à 100° qui libère, d'une part, les acides gras qui se présentent sous la forme de savons de baryum insolubles dans l'eau, d'autre part une fraction phosphorée hydrosoluble.

(12) Anderson (voir page 62), au contraire, décrit dans les produits d'hydrolyse par la potasse alcoolique de son phosphatide dit « purifié » des acides organophosphoriques précipitables par l'acétate de plomb et contenant des glucides. Si ce fait est exact, il est possible que la liaison ester glucidophosphorique résiste mieux à une hydrolyse par la potasse alcoolique que par la baryte aqueuse.

(13) Ces fractions sont les trois fractions prises comme exemples dans le résumé du chapitre II.

On fractionne les produits hydrosolubles des trois hydrolysats barytiques par précipitation par l'acétate neutre de plomb, puis par l'acétate basique de plomb et l'ammoniaque. On obtient les résultats suivants :

L'hydrosoluble de l'hydrolysat barytique de la fraction la plus active **[A]** est constituée par (voir tableau X, page 170) :

1° Une fraction précipitable par l'acétate neutre de plomb. Elle est composée par de l'acide glycérphosphorique simple et par une très petite quantité d'acide inositophosphorique.

2° Une fraction soluble dans l'alcool-éther. Elle est constituée par du glycérol libre (souillé par de l'acétate de baryum provenant des réactifs introduits lors de l'hydrolyse barytique et lors du fractionnement de l'hydrolysat).

3° Une fraction non précipitable par l'acétate neutre de plomb ni par l'acétate basique, mais qui précipite par l'acétate basique de plomb additionné d'ammoniaque. Cette fraction contient du phosphore, des glucides non réducteurs, de l'inositol et du glycérol. Elle n'est pas constituée par une molécule unique, mais par un mélange de substances.

Le phosphore est sous la forme d'acides organophosphoriques complexes qui possèdent trois fonctions acides libres pour deux atomes de phosphore.

L'hydrolyse sulfurique à 120° décompose les esters phosphoriques complexes non précipitables par l'acétate de plomb et libère la totalité du phosphore sous la forme d'acide glycérphosphorique simple précipitable par l'acétate de plomb. Cet acide glycérphosphorique est donc lié à autre chose (vraisemblablement des oses et de l'inositol) pour former des esters glycérphosphoriques complexes.

Les glucides sont uniquement constitués par des aldohexoses (ils ne renferment ni cétose, ni pentose, ni acide uronique).

La fraction hydrosoluble de l'hydrolysat barytique de la fraction inactive la moins soluble **[Im]** possède une constitution analogue à celle de la fraction active **[A]** ; elle ne présente que quelques différences d'ordre quantitatif (voir tableau XII, page 188).

La fraction précipitée par l'acétate neutre de plomb provenant de **[Im]** est moins abondante et elle ne renferme que de l'acide glycérphosphorique.

La fraction précipitée par l'acétate basique de plomb en présence d'ammoniaque est moins riche en inositol, mais plus riche

en glucides qui sont également constitués par des aldohexoses. L'hydrolyse sulfurique à 120° des esters phosphoriques complexes non précipitables par l'acétate de plomb contenus dans cette fraction, libère également de l'acide glycérophosphorique, mais aussi une très petite quantité d'acide inositolphosphorique.

La fraction hydrosoluble de l'hydrolysate barytique de la fraction [Ip] est à peu près uniquement constituée par de l'acide glycérophosphorique et par du glycérol (voir tableau XI, page 184).

Les fractions insolubles dans l'eau des hydrolysats des fractions [A] et [Ip] ne contiennent que des acides gras (et une petite quantité de phosphate de baryum). La fraction insoluble dans l'eau de l'hydrolysate barytique de [Im] contient également des acides gras, mais aussi une substance insoluble dans l'éther qui représente vraisemblablement un insaponifiable qui entre dans la constitution d'une « cire » insoluble dans l'eau qui était une impureté de cette fraction. Les acides gras séparés des trois fractions possèdent des poids moléculaires sensiblement identiques, mais tandis que les acides gras des fractions [A] et [Im] sont saturés, les acides gras de la fraction [Ip] sont riches en acides non saturés.

La fraction inactive la plus soluble [Ip] possède une constitution relativement simple et se différencie nettement des deux autres fractions. Elle est pratiquement constituée par des sels de sodium, de calcium et de magnésium d'**acides glycérophosphatidiques** contenant des acides gras non saturés. Ces glycérophosphatidates simples et banaux sont dénués de toute activité hapténique.

La fraction la plus active [A] paraît constituée par des sels de sodium, de calcium et de magnésium d'un mélange de deux types d'acides phosphatidiques qui ne contiennent que des acides gras saturés.

1° *des acides glycérophosphatidiques simples* analogues à ceux qui constituent la fraction [Ip] (mais ne contenant que des acides gras saturés) et peut-être aussi une petite quantité d'acide inositolphosphatidique.

2° *des acides glycérophosphatidiques plus complexes* dans lesquels l'acide glycérophosphorique est certainement lié à autre chose (très vraisemblablement à des oses et à de l'inositol) pour constituer des acides glycérophosphoriques complexes qui sont estérifiés par des acides gras.

La fraction inactive la moins soluble [Im] possède une constitution analogue à celle de la fraction **[A]**; elle paraît renfermer une quantité moindre d'*acides glycérophosphatidiques simples*, mais, au contraire, une *plus forte proportion d'acides glycérophosphatidiques complexes*. Elle contiendrait peut-être aussi une petite quantité d'acide inositolphosphatidique complexe. Les acides gras sont également tous saturés. La fraction **[Im]** contient en outre comme impureté une petite quantité de « cire ».

L'étude des cations, des acides gras, des esters phosphoriques simples et complexes et des alcools (glycérol, oses, inositol) contenus dans les trois fractions **[A]**, **[Ip]** et **[Im]** ne nous a pas permis jusqu'à présent de découvrir dans la fraction la plus active **[A]** une substance à laquelle on puisse attribuer son activité et sa spécificité sérologique. Cette étude comparative est résumée dans le tableau suivant.

TABLEAU XV

	Inactive la plus soluble [Ip]	Fractions la plus active [A]	Inactive la moins soluble [Im]
Pouvoir hapténique H	1/10	1/4.500	1/200
Phosphore p. 100	4,39	2,82	1,45
Azote p. 100	0,67	0,13	0,03
Cations	Na, Ca Mg	Na, Ca Mg	Na, Ca Mg
Glycérol	présence	présence	présence
Glucides p. 100	0,42	5,95 aldohexoses	16,7 aldohexoses
Inositol	0	présence (+ + + +)	présence (+ + +)
Acides gras { Poids p. 100	66	56	44
{ Poids moléculaire .	282	278	279
{ Indice d'iode	64	5	3
Insaponifiable insoluble dans l'éther p. 100	0	0	13

*Etude chimique comparative des trois fractions :
la moins active, l'inactive la plus soluble et l'inactive
la moins soluble*

Aucun des constituants que nous avons pu doser ou mettre en évidence ne se montre caractéristique de la fraction **[A]**.

Cependant l'activité sérologique de cette fraction est considérable (on peut la mettre en évidence à la dose de 0,06 γ). La molécule de l'haptène ne constitue probablement qu'une faible portion de la fraction [A].

Hydrolyse sulfurique à froid

On peut également décomposer les fractions très actives par une hydrolyse sulfurique à froid qui libère les acides gras sans décomposer les esters phosphoriques complexes qui constituent alors la majeure partie de la fraction hydrosoluble de l'hydrolysat. Lorsque l'on soumet ces esters phosphoriques complexes à une hydrolyse barytique à 120°, on libère d'une part de l'acide glycérophosphorique simple, et d'autre part des oses et de l'inositol. Ce fait permet de conclure que les esters organophosphoriques complexes que contiennent les fractions très actives sont constitués par de l'acide glycérophosphorique simple estérifié par des glucides et de l'inositol, pour former un acide glycérophosphorique complexe, qui est lié par estérification à des acides gras.

Cette hydrolyse sulfurique à froid permet de libérer les acides gras sans décomposer les osides. Cependant la totalité de l'activité hapténique disparaît au cours de cette opération. Il faut donc admettre que si des osides entrent dans la constitution de l'haptène de déviation du Bacille tuberculeux, ces osides seuls sont incapables de fixer l'alexine en présence de sérum antituberculeux. C'est seulement une combinaison de ces osides qui pourrait être active.

RÉSUMÉ
ET
CONCLUSIONS GÉNÉRALES

RESUME ET CONCLUSIONS GENERALES

Les extraits alcooliques de Bacilles tuberculeux possèdent la propriété de se combiner spécifiquement avec les anticorps contenus dans les sérums d'hommes et d'animaux tuberculeux pour former un complexe qui fixe l'alexine. On attribue cette propriété à la présence d'une substance encore inconnue et spécifique de ce bacille : un haptène de fixation de l'alexine. On le désigne habituellement par le terme « haptène lipoidique » du Bacille tuberculeux, car il accompagne certains lipides dans les extraits lipoidiques de ce bacille.

L'importance biologique et immunologique d'une telle substance hapténique nous a incité à entreprendre son isolement pour tenter d'élucider sa composition chimique, mais le problème nous est apparu comme particulièrement complexe et délicat, et la connaissance exacte de cet haptène lipoidique demandera probablement encore de longues recherches. Notre travail nous a permis, cependant, de préciser et de limiter les éléments du problème. Nous avons pu éliminer définitivement de la question certains phosphatides inactifs dont nous avons pu établir la constitution chimique. Nous avons, en outre, appris à connaître un certain nombre des propriétés de l'haptène.

Dans une étude bibliographique, nous avons réuni et exposé les recherches chimiques effectuées sur les divers haptènes lipoidiques connus d'origine animale et microbienne. Bien qu'il ne soit pas encore possible de définir chimiquement ce groupe d'haptènes, car leur composition est encore très mal connue, ils présentent cependant un certain nombre de propriétés physico-chimiques et biologiques communes qui justifient leur réunion dans un même groupe. Pour désigner ces haptènes, nous avons conservé le terme habituellement employé d'haptènes lipoidiques, car leurs propriétés communes paraissent dues à une nature lipidique

ou, tout au moins, à des propriétés physico-chimiques très voisines de celles des lipides.

Seule l'étude chimique de l'un de ces haptènes, l'haptène lipoidique de Forssman a donné quelques résultats positifs. Cet haptène que l'on rencontre dans les extraits lipoidiques de certains tissus animaux, a fait l'objet d'un nombre considérable de travaux effectués par de multiples auteurs, et cependant sa molécule n'a pas pu être encore isolée. On possède seulement, à l'heure actuelle, quelques renseignements sur sa structure : son groupement spécifique est de nature glucidique, mais il paraît inclus dans une molécule lipidique. Ces connaissances, encore très imprécises, ont pu être acquises, en grande partie, grâce à la stabilité de cet haptène et surtout à sa résistance aux alcalis, qui permet de détruire par une simple saponification la majeure partie des lipides qui l'accompagnent dans les extraits lipoidiques.

Lorsque nous avons abordé l'étude de l'haptène lipoidique du Bacille tuberculeux, nous nous sommes heurtée à des difficultés encore plus grandes que celles qu'ont rencontrées les savants qui étudièrent l'haptène de Forssman.

Il nous a fallu, tout d'abord, mettre au point une technique pratique permettant d'extraire avec un bon rendement l'haptène lipoidique contenu dans des masses considérables d'une matière première défavorable, mais économique : « les Bacilles de la Tuberculine » que nous pouvions nous procurer en quantité importante.

Comme c'est toujours le cas pour les haptènes lipoidiques, l'haptène du Bacille tuberculeux accompagne les phosphatides. Il est particulièrement difficile de séparer sa molécule d'avec les lipides qui la souillent.

Lorsque nous avons entrepris le fractionnement de ces phosphatides, en vue d'isoler l'haptène, les réactifs acides et alcalins nous sont rapidement apparus comme inutilisables, car ils font perdre, même à froid, toute activité hapténique aux préparations. Seul est donc possible l'emploi de solvants neutres, mais, dans ces conditions, les fractionnements sont considérablement entravés par des phénomènes de solubilisation réciproque particulièrement intenses. Ce n'est qu'après des fractionnements répétés et systématiques que nous avons pu arriver à obtenir des fractions nettement différentes tant du point de vue hapténique que du point de vue chimique.

Enfin, nous avons rencontré d'autres difficultés, car la fraction phosphatidique soluble dans l'éther des lipides des « Bacilles de la Tuberculine » ne présente pas la composition habituelle des phosphatides extraits des animaux et végétaux supérieurs. D'une part, elle renferme des lipides d'un type particulier et nouveau, et d'autre part elle contient des impuretés lipidiques très difficiles à éliminer du fait de leur insolubilité dans l'acétone même bouillante.

Cependant, grâce à de nombreuses purifications et à des fractionnements successifs, nous sommes parvenue à concentrer l'haptène dans une unique fraction qui présente une activité sérologique considérable (dose limite efficace : 0,06 γ). Bien que cette fraction ait résisté à tout nouvel essai de fractionnement, elle nous paraît encore constituée par un mélange de substances voisines.

Après évaporation de sa solution chloroformique, cette fraction se présente sous la forme d'une masse incolore, vitreuse et amorphe, dure et cassante et très hygroscopique. Elle est très soluble dans l'éther et dans le chloroforme, soluble dans l'acide acétique glacial et la pyridine, un peu soluble dans l'alcool méthylique, et totalement insoluble dans l'acétone même bouillante. Elle donne avec l'eau une solution parfaitement limpide, optiquement vide à l'ultra-microscope et extrêmement visqueuse. Cette solution aqueuse est totalement incapable de dialyser à travers une membrane de collodion. Cette fraction possède une très grande affinité pour l'eau ; lorsque l'on traite sa solution éthérée par de l'eau, la totalité de la substance passe dans la phase aqueuse, et si l'on acidifie cette phase aqueuse par un acide minéral N/10 la moitié seulement environ de la substance repasse dans la phase éthérée.

Cette fraction active contient du phosphore (2,8 p. 100), elle ne renferme pas de soufre et seulement des traces d'azote (0,1 p. 100). Elle contient également de petites quantités de sodium, de calcium et de magnésium.

Cette fraction est riche en acides gras (56 p. 100), qui sont entièrement saturés, et possèdent un poids moléculaire moyen de 278. Elle renferme une petite quantité de glucides non réducteurs (6 p. 100) qui sont uniquement constitués par des aldohexoses. Elle contient également de l'inositol et du glycérol.

Cette fraction, si active comme haptène de fixation de l'ale-

xine, ne possède aucun pouvoir antigénique *in vivo* et aucune propriété hapténique de précipitation : elle renferme un haptène strict de fixation de l'alexine.

Ce pouvoir hapténique résiste très bien à l'action de la chaleur (120°) en milieu neutre, mais il est rapidement détruit par les acides et les alcalis même dilués et à froid. Les acides gras de cette fraction sont libérés en totalité, en quelques jours, à 15°, par de l'acide sulfurique N/1.

Si nos fractionnements n'ont pas abouti à l'isolement de la molécule de l'haptène, ils nous ont au moins conduit à l'obtention d'une préparation d'une activité considérablement supérieure à toutes celles qu'on avait pu obtenir dans le cas du *Bacille tuberculeux*. Nos études nous ont, en outre, permis d'effectuer quelques constatations biochimiques et chimiques intéressantes au sujet des lipides phosphorés des bacilles.

La fraction phosphatidique soluble dans l'éther, et insoluble dans l'acétone bouillante que l'on obtient lorsque l'on étudie les lipides des « *Bacilles de la Tuberculine* » ne ressemble nullement aux phosphatides que l'on décrit habituellement chez les animaux et les plantes. Nous avons montré que ces phosphatides ne contiennent ni lécithine, ni céphaline, mais uniquement des lipides phosphorés non azotés : des sels d'acides phosphatidiques.

S'il existe bien dans le *Bacille tuberculeux* des acides phosphatidiques relativement simples, comparables à ceux que Chibnall et Channon ont pu isoler des feuilles de certains végétaux, il existe également des acides phosphatidiques plus complexes qui représentent un type nouveau de lipides phosphorés. Mais il est très difficile de fractionner ces divers acides phosphatidiques, car ils possèdent des propriétés et une composition très voisines.

Tous ces acides phosphatidiques simples et complexes sont à l'état de sels de sodium, de calcium et de magnésium.

Dans tous ces acides phosphatidiques simples et complexes, la totalité de l'acide phosphorique est estérifiée par du glycérol.

Les acides phosphatidiques simples possèdent la composition des acides glycérophosphatidiques découverts chez les végétaux : l'acide glycérophosphorique y est estérifié par un mélange d'acides gras saturés et non saturés.

Dans les acides phosphatidiques complexes, nous avons pu mon-

trer que l'acide glycérophosphorique est uni à d'autres polyols (glucides non réducteurs et inositol) par des fonctions esters phosphoriques pour former des esters glycérophosphoriques complexes, ces esters glycérophosphoriques complexes sont eux-mêmes estérifiés par des acides gras qui sont tous saturés, pour former un nouveau type de lipide phosphoré : *les acides glycérophosphatidiques complexes*.

Quand on fractionne le mélange de ces acides phosphatidiques, on s'aperçoit qu'il en est parmi eux qui sont totalement dénués de pouvoir hapténique. Nous pouvons donc déjà conclure que si l'activité hapténique caractérise un acide phosphatidique, elle ne les caractérise pas tous.

Les acides glycérophosphatidiques simples et banaux ne possèdent aucune activité sérologique.

L'haptène se concentre dans une fraction constituée par des acides glycérophosphatidiques complexes, mais tous les acides complexes ne sont pas actifs.

La complexité des substances si voisines qui se trouvent mélangées dans les fractions actives a rendu infructueuses, jusqu'ici, toutes les tentatives d'isolement de la molécule hapténique. Ne parvenant pas à isoler l'haptène, nous avons alors soumis à une étude chimique comparative les diverses fractions active et inactives que nous avons séparées du mélange des acides phosphatidiques, afin de voir si un constituant particulier ou une impureté particulière caractérisait la fraction active et n'était pas contenu dans les fractions inactives voisines ; mais jusqu'à présent, nos recherches sur ce point sont demeurées infructueuses. Ces faits nous ont conduit à émettre deux hypothèses au sujet de la nature de l'haptène lipoidique, sans que nous puissions choisir avec certitude entre ces hypothèses.

1° L'activité hapténique de nos préparations les plus actives ne serait due qu'à une infime partie de ces fractions. La molécule de l'haptène pourrait alors posséder une constitution très différente de celles des acides phosphatidiques complexes dont elle ne constituerait qu'une impureté. Il faudrait dans ce cas admettre que l'activité sérologique de la substance hapténique soit considérablement plus grande que celle de nos préparations qui sont déjà douées d'une activité extrêmement élevée.

2° L'haptène constituerait une partie relativement importante de nos préparations les plus actives dans lesquels il se trouverait mélangé à quelques substances très voisines. L'haptène serait alors un acide phosphatidique complexe, peu différent chimiquement des autres acides phosphatidiques complexes inactifs, mais dont la molécule renfermerait un constituant ou un groupement chimique particulier qui serait responsable de l'activité et de la spécificité sérologique.

Quoiqu'il en soit, l'ensemble des faits observés au cours de ce travail permet de penser que l'haptène lipodique du Bacille tuberculeux est de nature lipidique.

En effet : 1° que l'on extraie l'haptène lipodique contenu dans les bacilles avec de l'eau, ou qu'on l'extrait avec des solvants organiques, il accompagne toujours des phosphatides ;

2° au cours des diverses purifications auxquelles nous avons soumis les préparations hapténiques, c'est uniquement dans les fractions lipidiques que l'on retrouve l'activité sérologique et on la retrouve en totalité dans ces fractions ;

3° après de multiples fractionnements, on voit l'haptène se concentrer dans une unique fraction qui ne renferme certainement pas de protéides et qui ne contient pas de glucides libres. Elle est en majeure partie constituée par des acides glycérophosphatidiques complexes qui renferment des osides et de l'inositol.

Lorsque l'on sépare par une hydrolyse très douce, les acides gras de ces fractions actives, on voit disparaître toute trace d'activité hapténique. Il se peut que dans le cas de l'haptène lipodique du Bacille tuberculeux on doive, comme dans le cas de nombreux haptènes, attribuer un rôle immunologique à des constituants glucidiques, mais, ici, ces glucides seuls, lorsqu'ils sont dégagés de leur combinaison, sont incapables de fixer l'alexine en présence de sérum antituberculeux.

Il semble donc difficilement convenable qu'une substance non lipidique puisse ainsi, au cours de toutes ces opérations, rester spécifiquement accrochée à une fraction lipidique et à une seule, les acides phosphatidiques complexes, sans que certaines similitudes de constitution chimique rapprochent les lipides constitutifs de cette fraction de la substance hapténique.

BIBLIOGRAPHIE

1. AGULHON et FROUIN. — Bull. Soc. Chim. Biol., 1919, 1, 176.
2. ANDERSON R. J. — J. Biol. Chem., 1922, 12, 447 et 1914, 18, 425 et 441.
3. ANDERSON R. J. — J. Biol. Chem., 1927, 74, 525.
4. ANDERSON et collab. — J. Biol. Chem., 1927, 74, 537 ; 1929, 83 ; 1930, 89, 399 et 64. — J. Amer. Chem. Soc., 1930, 52, 1252, 1607 et 5023, et Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1930, 27, 387.
5. ANDERSON R. J. — Physiol. Rev., 1932, 12, 166.
6. ANDERSON, LOTHROP et GREIGHTON. — J. Biol. Chem., 1938, 123, 299.
7. AUCLAIR et PARIS. — C. R. Ac. Sc., 1907, 144, 278.
8. AVERY et GOEBEL. — J. Exp. Medr., 1933, 58, 731.
9. BALBI. — Z. Immunotatsforisch., 1938, 78, 524.
10. BAUDRAN. — C. R. Ac. Sc., 1906, 143, 657.
11. BERGER et SCHOLER. — Biochem. Z., 1932, 76, 16.
12. BISCEGLIE. — Biochem. Terap. sper., 1928, 15, 299.
13. BLOCH K. — Z. Physiol. Chem. 1936, 244, 1.
14. BORDET. — Traité de l'immunité dans les maladies infectieuses. — Masson, Paris, 1920.
15. BORDET et GENGOÛ. — Am. Inst. Pasteur, 1901, p. 297.
16. BOIVIN. — 1^{er} Congrès International des Microbiologistes de langue française, Inst. Pasteur, Paris, 1938.
17. BONNEFOI. — Thèse de Doctorat (Médecine), Paris, 1935.
18. BRAHN et SCHIFF. — Klin. Woch., 1926, p. 1455.
19. BRAHN et SCHIFF. — Klin. Woch., 1929, p. 1525.
20. BRAHN, SCHIFF et WEINMANN. — Klin. Woch., 1932, p. 1592 ; Btsch. med. Woch., 1933, p. 199.
21. BREIER. — Z. Immunitatsforsch. 1931, 71, 477.
22. BRETEY. — C. R. Soc. Biol., 1933, 113, 350.

23. BRONFENBRENNER. — J. lab. et clin. med., 1917, 3, 50.
24. BROWNING, CRUICKSHAW et Mc KENSIE. — Biochem. Z., 1910, 25, 85.
25. BRUNIUS. — Biochem. Z., 1933, 207, 258.
26. BRUNIUS. — Chemical studies on the true Forssman hapten Stockholm, 1936.
27. CARRÉ. — Thèse doctorat ès-Sciences, Paris, 1904.
28. CHARGAFF. — Z. physiol. Chem., 1931, 221.
29. CHARGAFF et DIERYCK. — Biochem. Z., 1932, 255, 319.
30. CHANNON et FOSTER. — Biochem. J., 1934, 28, 852.
31. CHIBNALL et CHANNON. — Biochem. J., 1927, 21, 225, 233 et 479 ; 1927, 24, 1112.
32. COMBIESCO, SORU, STOMATESCO, NETORESICO et AUBERT. — C. R. Soc. Biol., 1932, 109, 791.
33. CROWDER et ANDERSON. — J. Biol. Chem., 1934, 104, 399.
34. DAUTWITZ et LANDSTEINER. — Hofm. Breitr. 1907, 9, 431.
35. DENIGÈS. — C. R. Ac. Sc., 1909, 148, 12, 182 et 422.
37. DESSY. — Ball. Ist. sieroter., Milan, 1928, 7, 599.
38. DESSY et FRANCIOLI. — Boll. Ist. sieroter. Milan, 1929, 13, 497.
39. DIENES. — J. Immunol., 1929, 17, 85 et 157.
40. DIENES. — J. Immunol., 1930, 18, 285.
41. DIENES et BALAS. — Amer. Rev. Tubere., 1927, 9, 144.
42. DIENES et FREUND. — J. Immunol., 1926, 12, 137.
43. DIENES et SCHIFF. — J. Immunol., 1926, 12, 123.
44. DOERR et HALLAUER. — Z. Immunitätsforsch. 1925, 15, 170.
54. DOERR et PICK. — Biochem. Z., 1913, 50, 129.
46. EAGLE. — J. exp. Med., 1932, 55, 677.
47. EPSTEIN et PAUL. — Kolloïd. Z., 1921, 29, 310.
48. FETHKE. — Thèse doctorat (Médecine), Paris, 1938.
49. FISCHER. — Z. Immunitätsforsch. 1937, 90, 348.
50. FISCHER et GUNSBERGER. — Z. Immunitätsforsch. 1935, 88, 233 ; 1936, 87, 400.
51. FONTES et THIVOLLE, d'après DERRIEN et FONTES. — Chimie Biologique médicale, Baillière, Paris, 1927.
52. FORSSMAN. — Biochem. Z., 1911, 37, 78.
53. FRANK. — Klin. Woch., 1922, 1, 149. — Wien. Arch. Med., 1925, 10, 1357.

54. FREUND. — J. Immunol., 1927, 13, 161.
55. FREUNDENBERG et EICHEL. — Ann. der Chem., 1935, 518, 97.
56. FREUNDENBERG, WESTPHAL et GROENEMOND. — Naturwiss., 1936, 24, 522. r
57. FRIEDBERGER et SUTO. — Z. Immunitätsforsch. 1919, 28, 216.
58. GEORGI. — Arb. Ist. exp. Therapie Frankf. a. M., 1919, 9, 33.
59. GOEBEL. — J. Biol. Chem., 1935, 110, 391 (B.).
60. GOEBEL et GOODNER. — Proc. Amer. Soc. Biol. Chem., 30^e Congrès annuel, Washington, mars 1936.
61. GONZALEZ et ARMANGUE. — C. R. Soc. Biol., 1931, 106, 1006.
62. GOUGH. — Biochem. J., 1932, 26, 248.
63. GOYAL. — Ann. Inst. Pasteur, 1937, 59, 94.
64. HAMMERSCHLAG. — Sitzinsber. d. k. Akad. d. Wissensch., 1888.
65. HECHT. — Z. Tuberk., 1935, 74, 28.
66. HEIDELBERGER et AVERY. — J. exp. Med., 1923, 38, 73.
67. HEIDELBERGER, AVERY et GOEBEL. — J. exp. Med., 1925, 49, 847.
68. HEIDELBERGER, GOEBEL et AVERY. — J. exp. Med., 1925, 42, 727.
69. HEIDELBERGER et MENTZEL. — Proc. Soc. exp. Bio. med., 1931, 29, 631.
70. HEIDELBERGER et MENZEL. — J. Bio. Chem., 1937, 118, 79.
71. HEIDUSCHKA et NEUMANN. — J. prakt. chem., 1938, 151, 1.
72. JACOBS. — J. exp. Med., 1934, 59, 479.
73. JOLY. — Thèse de doctorat (Pharmacie), Paris, 1937.
74. JORPES et NORLIN. — Z. Immunitätsforsch., 1933, 81, 152.
75. KLOPSTOCK. — Dtsch. med. Wschr., 1925, p. 1701 ; 1926, p. 1460. — J. exp. Med., 1927, 45, 465.
76. KLOPSTOCK et MISAWA. — Z. Immunitätsforsch., 1933, 79, 53.
77. KRESLING. — Arch. des Sc. biol., St Petersburg, 1902, 9, 359.
78. LANDSTEINER. — Biochem. Z., 1921, 119, 294.
79. LANDSTEINER. — Science, 1932, 76, 351. — J. exp. Med., 1936, 63, 185.
80. LANDSTEINER. — The specificity of serological reactions, Baltimore, 1936.
81. LANDSTEINER et CHASE. — Proc. Soc. exp. Biol. med., 1935, 32, 713 et 1208.

82. LANDSTEINER et CHASE. — J. exp. Med., 1936, 63, 813.
83. LANDSTEINER et V. EISLER. — Wien. Klin. Woch, 1904, p. 676.
— Zbl. f. Bakt., 1905, 30, 309.
84. LANDSTEINER et FOX, d'après (80), p. 56.
85. LANDSTEINER et JACOBS. — Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1932,
29, 570.
86. LANDSTEINER et JACOBS. — Proc. Soc. exp. Biol. med., 1933,
30, 1055.
87. LANDSTEINER et LAMPL. — Z. Immunitätsforsch., 1917, 26,
293.
88. LANDSTEINER et LAMPL. — Z. Immunitätsforsch., 1917, 26,
258.
89. LANDSTEINER et LAMPL. — Biochem. Z., 1918, 86, 343.
90. LANDSTEINER et LEVÈNE. — J. Immunol., 1925, 10, 731.
91. LANDSTEINER et LEVÈNE. — Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1925-
1926, 23, 343.
92. LANDSTEINER et LEVÈNE. — Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1926-
1927, 24, 693.
93. LANDSTEINER et LEVÈNE. — J. Immunol., 1927, 14, 81.
94. LANDSTEINER, LEVÈNE et V. DER SCHEER. — J. exp. Med.,
1927, 46, 197.
95. LANDSTEINER, MUELLER et POETZL. — Wien. Klin. Woch.,
1907, 20, 1565.
96. LANDSTEINER et PRASEK. — Bioch. Z., 1914, 61, 191.
97. LANDSTEINER et SIMMS. — J. exp. Med., 1923, 38, 127.
98. LANDSTEINER et VAN DER SCHEER. — J. exp. Med., 1925, 41,
427.
99. LANDSTEINER et VAN DER SCHEER. — J. exp. Med., 1925, 42,
132 ; Proc. soc. exp. Biol. Med., 1925, 22, 289.
100. LANDSTEINER et VAN DER SCHEER. — J. exp. Med., 1934, 59,
751.
101. LANDSTEINER et VAN DER SCHEER. — J. exp. med., 1938, 67,
709.
102. LATTES. — Wien. Klin. Woch., 1928, p. 1038.
103. LEVADITI et YAMAMOUCHI. — C. R. Soc. Biol., 1907, 43, 740 ;
1908, 44, 27 et 349.
104. MACHEBŒUF. — Bull. Soc. Chim. Biol., 1926, 8, 464.
105. MACHEBŒUF et BONNEFOI. — Bull. Soc. Chim. Biol., 1935, 17,
1201.

105. MACHEBŒUF et CASSAGNE. — C. R. Ac. Sc., 1935, 300, 1988.
107. MACHEBŒUF et DIERYCK. — C. R. Congrès International de Chimie, Madrid, 1934, vol. 5, p. 290.
108. MACHEBŒUF et DIERYCK. — C. R. Soc. Bio., 1935, 119, 917.
109. MACHEBŒUF et DIERYCK. — C. R. Ac. Sc., 1936, 202, 164.
110. MACHEBŒUF et DIERYCK. — 6^e Congrès de Chimie biologique, Paris, 1937.
111. MACHEBŒUF, DIERYCK et STOP. — Ann. Inst. Pasteur, 1935, 54, 71.
112. MACHEBŒUF et FETHKE. — Bull. Soc. Chim. Biol., 1936, 18, 366.
113. MACHEBŒUF, LÉVY et CHAMBAZ. — Bull. Soc. Chim. Biol., 1935, 17, 1194.
114. MACHEBŒUF, LÉVY et FAURE. — Bull. Soc. Chim. biol., 1935, 17, 1210.
115. MACHEBŒUF, LÉVY et FAURE. — C. R. Ac. Sc., 1937, 204, 1843.
116. MACHEBŒUF, LÉVY, FETHKE, DIERYCK et BONNEFOI. — Bull. Soc. Chim. biol., 1934, 16, 355.
117. MACHEBŒUF, SANDOR et NINNI. — C. R. Ac. Sc., 1932, 195, 275.
118. MAC LEAN. — Lecithin and allied substances, London, 1918, p. 170.
119. MATER. — Z. Immunitätsforsch, 1933, 78, 1.
120. MARIE et LEVADITI. — Ann. Inst. Pasteur, 1907, 21, 138.
121. MAXIM. — Biochem. Z., 1930, 233, 404.
122. MERKENS. — Z. Immunitätsforsch., 1933, 78, 308.
123. MEYER. — Z. Immunitätsforsch., 1910, 7, 732.
124. MEYER. — Z. Immunitätsforsch., 1912, 14, 359.
125. MEYER. — Biochem. Z., 1921, 122, 225.
126. MEYER. — Z. Immunitätsforsch., 1938, 68, 98 ; 1930, 31, 69, 134 et 499.
127. MEYER. — C. R. Soc. Biol., 1936, 122, 1037 ; 124, 430 ; 1938, 127, 947. — Ann. Inst. Pasteur, 1937, 59, 477.
128. MEYER et FIG. — Ann. Inst. Pasteur, 1937, 59, 594.
129. MEYER et MORGAN. — Brit. J. exp. Med., 1935, 61, 476.
130. MILLER et BOOR. — J. exp. Path., 1934, 59, 75.
131. MORGAN. — Brit. J. exp. Path., 1932, 13, 342.
132. MUCH et LESCHKE. — Beitr. Z. Klin. Tuberk., 1911, 20, 341.

133. NÈGRE et BOQUET. — C. R. Soc. Biol., 1920, 83, 922 et 960.
134. NÈGRE et BOQUET. — C. R. Soc. Biol., 1921, 84, 76 ; 1922, 86, 581, 653, 713 ; 123, 88, 1068.
135. NÈGRE et BOQUET. — Ann. Inst. Pasteur, 1921, 35, 300.
136. NÈGRE et BOQUET. — Ann. Inst. Pasteur, 1923, 37, 787.
137. NÈGRE et BOQUET. — Le traitement de la tuberculose par l'antigène méthylique. — Masson, Paris, 1925.
138. NICOLLE. — Microbiologie générale et immunologie. — Masson, Paris, 1920.
139. NINNI. — Ann. Inst. Pasteur, 1932, 49, 186.
140. NINNI. — Ann. Inst. Pasteur, 1935, 52, TQL ; 1935, 55, 38.
141. NOGUCHI. — Sérum diagnosis of syphilis, 1912, p. 79.
142. ORNSTEIN. — Wien. Klin. Woch., 1926, p. 785.
143. PARNAS et WAGNER. — Biochem. Z., 1921, 125, 253.
144. PETROFF. — Ann. Rev. Tuber., 1920, 3, 683.
145. PLAUT et KASSOWITZ. — Z. Immunitätsforsch., 1930, 66, 152.
146. PLAUT et RUDY. — Z. Immunitätsforsch., 1932, 73, 385.
147. PORGES et MEIER. — Berl. Klin. Woch., 1908, 45, 731.
148. POSTERNAK S. et T. — C. R. Ac. Sc., 1928, 186, 261.
149. POSTERNAK. — Helv. Chim. Acta, 1935, 18, 1351.
150. RAITRICK et TOPLEY. — Brit. J. exp. Path., 1934, 15, 113 (B.).
151. ROBINSON et KING. — Biochem. J., 1931, 25, 323.
152. ROBINSON et MORGAN. — Biochem. J., 1930, 24, 119.
153. RUDY. — Biochem. Z., 193, 26Z, 77 (B.). — Klin. Woch. 1932, p. 312 et 1432 ; 1933, p. 1279.
154. SACHS. — Z. Immunitätsforsch., 1933, 80, 222.
155. SACHS et ALTMANN. — Berl. Klin. Woch., 1908, 45, 494.
156. SACHS et KLOPSTOCK. — Biochem. Z., 1925, 159, 491.
157. SACHS, KLOPSTOCK et WEIL. — Dtsch. Med. Wachr., 1925, p. 589 et 928 ; 1926, p. 650 ; 1927, p. 394.
158. SACHS et RONDONI. — Z. Immunitätsforsch., 1909, 1, 133.
159. SACHS et SCHAWB. — Schweiz. Med. Woch., 1936, 16, 547.
160. SAKAE TAMURA. — Z. physiol. chem., 1913, 87, 85 et 114.
161. SAKAKIBARA. — J. Bioch. Japan, 1936, 24, 31.
162. SANDOR. — Thèse de doctorat (Médecine), Paris, 194.
162. SANDOR et NINNI. — Ann. Inst. Pasteur, 1935, 55, 38.

164. SANDOR et SCHAEFFER. — Ann. Inst. Pasteur, 1934, 53, 72.
165. SCHIFF. — Über die gruppenspezifischen substanzen. — Iena, Fischer, 1931.
166. SCHIFF et ADELBERGER. — Zbl. Bakt., 1924, 93, 172.
167. SCHIFF et ADELBERGER. — Z. Immunitätsforsch., 1924, 40, 335.
168. SCHMIDT et COFFEY. — J. inf. dis., 1923, 32, 119.
169. SCHURMANN. — Wien Med. Klin., 1909, 5, 627.
170. SELTER. — Z. Immunitätsforsch., 1930, 68, 409.
171. SICKLES et SCHAW. — Proc. Soc. exp. Biol. med., 1934, 31, 443, 1935, 32, 857 (B.).
172. SMITH et CHIBNALL. — Biochem. J., 1932, 26, 1345.
173. SMITHE. — J. Biol. Chem., 1937, 117, 135.
174. SORDELLI et FISCHER. — Rev. Inst. bact., Buenos Aires, 1918, 1, 229.
175. SORDELLI, FISCHER, WERNICKE et PICO. — C. R. Soc. Biol., 1921, 84, 173.
176. SORDELLI, WERNICKE et DEULOFEU. — C. R. Soc. Biol., 1925, 92, 898.
177. STACEY, CHALLINOR et RAITRICK. — 2nd international Congres for microbiology, London, 1936.
178. STRENG. — Acta path. micro. Scand., 1938, 37, 498.
179. TADAO SUGAI. — Japan J. expt. Med., 1937, 15, 235, 243 et 249.
180. TANIGUCHI. — J. Path. Bact., 1921, 24, 217 et 241.
181. THIELE et EMBLETON. — J. Path. Bact., 1914-1915, 19, 349.
182. TOPLEY et OPENER. — 2nd international congres for microbiology, London, 1936.
- 182 bis. TRIBONDEAU, d'après BORDET (14), page 434.
183. TROPP. — Chem. Z. 1937, 31, 66.
184. URBAIN. — La réaction de fixation dans la tuberculose. — Masson, Paris, 1925.
185. VALTIS. — C. R. Soc. Biol., 1923, 87, 947 et 1153.
186. WADSWORTH et MALTANER. — J. Immunol., 1934, 26, 25.
187. WADSWORTH et MALTANER. — J. Immunol., 1935, 29, 151.
188. WASSERMANN, NIESSER et BRUCK. — Deut. Med. Woch., 1906, 32, 745.
189. WEIL et BERENDES. — Z. Immunitätsforsch., 1932, 73, 341.

190. WEIL et BERENDES. — *Klin. Woch.*, 1932, 11, 770.
 191. WEIL et BESSER. — *Klin. Woch.*, 1931, p. 1941.
 192. WEIL et BESSER. — *Z. Immunitätsforsch.*, 1932, 76, 76.
 193. WEIL et BRAUN. — *Wien. Klin. Woch.*, 1908, 21, 151.
 194. WEIL et RITZENTHALER. — *Zbl. Bakt.*, 1932, 127, 194.
 195. WEIL, RITZENTHALER et MERKENS. — *Z. Immunitätsforsch.*, 1933, 78, 316.
 196. WELLS et LONG. — *The Chemistry of tuberculosis*, Baltimore, 1932.
 197. WITEBSKY. — *Z. Immunitätsforsch.*, 1926, 48, 369 ; 49, 1.
 198. WITEBSKY, NETTTER et SOBOTKA. — *J. exp. Med.*, 1935, 61, 703.
 199. YAMAKAMI. — *J. Immunol.*, 1926, 12, 185.
 200. YOSIDA. — *J. exp. Mem.*, 1928, 63, 331.
-

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

Action des très hautes pressions
sur les micro-organismes : technique et résultats

Vu et approuvé :

Paris, le 8 Novembre 1939.

Le Doyen de la Faculté des Sciences :

Ch. MAURAIN.

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris :

G. ROUSSY.

IMPRIMERIE
DOURIEZ-BATAILLE
5, RUE JACQUEMARS-GIÉE
LILLE

